



(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)



1-0023957

(51)⁷ A01K 67/027; C12N 15/00

(13) B

(21) 1-2013-03927

(22) 16/05/2012

(86) PCT/US2012/038193 16/05/2012

(87) WO2012/158828 22/11/2012

(30) 61/519,076 16/05/2011 US

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/04/2014 313A

(73) THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF MISSOURI (US)

316 University Hall Columbia, Missouri 65211, United States of America

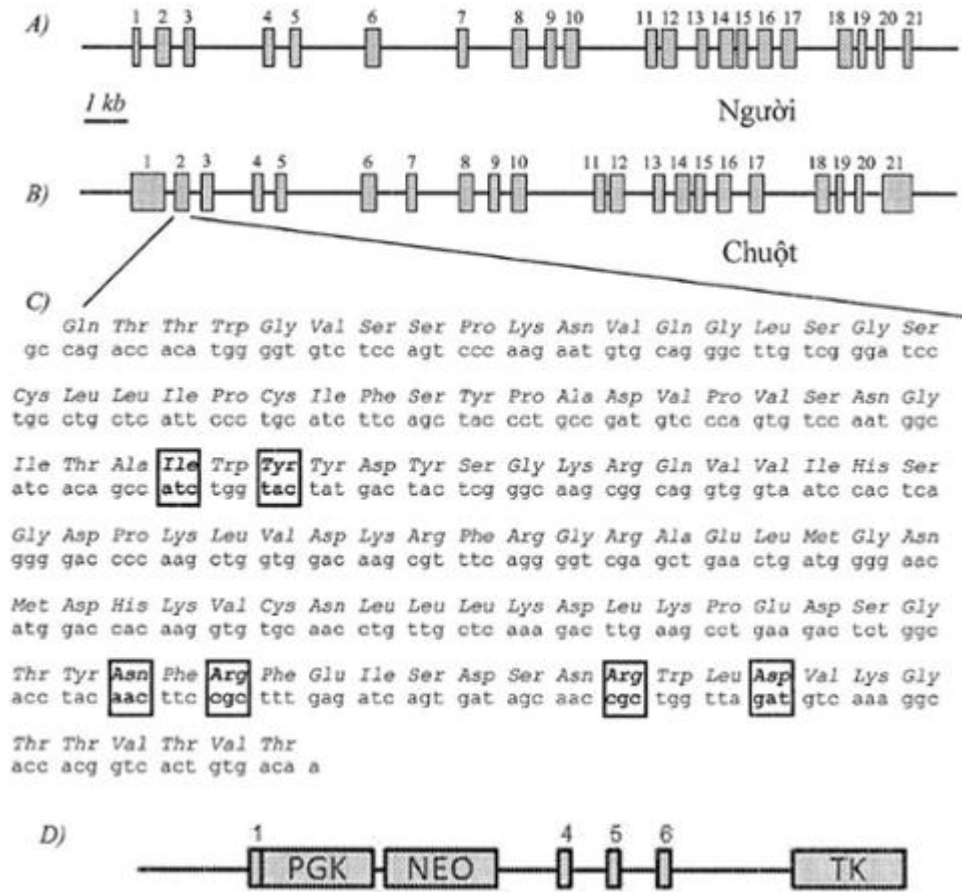
(72) PRATHER, Randall, S. (US); Kevin Wells (US); Kristin Whitworth (US)

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) LỢN BIẾN ĐỔI GEN KHÁNG VIRUT GÂY HỘI CHỨNG HÔ HẤP VÀ SINH
SẢN Ở LỢN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA LỢN BIẾN ĐỔI GEN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất lợn được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen SIGLEC1 bị làm bất hoạt và/hoặc ít nhất một alen của gen CD163 bị làm bất hoạt. Lợn được cải biến gen có cả hai alen của gen SIGLEC1 và hoặc cả hai alen của gen CD163 bị làm bất hoạt sẽ kháng lại virus hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất lợn chuyển gen này.

Tổ chức gen sialoadhesin và thiết kế vectơ hướng đích



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế đề cập đến lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* được làm bất hoạt và/hoặc ít nhất một alen của gen *CD163* được làm bất hoạt. Các phương pháp tạo ra lợn biến đổi gen này cũng được đề xuất.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) là một trong số các bệnh ở lợn có tầm quan trọng nhất về mặt kinh tế. Bệnh này được phát hiện lần đầu tiên Hoa Kỳ vào năm 1987 (Keffaber 1989) và ở châu Âu vào năm 1990 (Wensvoort et al., 1991). Phân tích phân tử virus PRRS kiểu đại (PRRSV) VR-2332 và Lelystad (các chủng phân lập lần lượt từ Hoa Kỳ và châu Âu) đã ám chỉ rằng các chủng tiến hóa bất đồng xuất hiện trên hai lục địa gần như đồng thời, có lẽ là do các thay đổi tương tự về thực tiễn quản lý lợn (Murtaugh et al., 1995; Nelsen et al., 1999). Từ khi bắt đầu xuất hiện, virus này đã lan rộng trên toàn thế giới, và PRRSV có kiểu gen châu Âu đã được phát hiện trên các đàn lợn ở Hoa Kỳ (Ropp et al., 2004). PRRS được đặc trưng không chỉ bởi bệnh hô hấp nghiêm trọng và đôi khi gây chết và tình trạng xáo trộn sinh sản, mà còn làm cho lợn bị lây nhiễm có khả năng bị nhiễm vi khuẩn gây bệnh cũng như virus gây bệnh khác (Benfield et al., 1992), và là yếu tố chủ yếu của bệnh hô hấp phức hợp ở lợn (Porcine Respiratory Disease Complex - PRDC) gây ảnh hưởng đáng kể đến nền kinh tế. Tổn thương bệnh lý phổ biến nhất mà PRRSV gây ra trong tình trạng lây nhiễm cấp tính là bệnh viêm phổi kẽ và bệnh viêm não bạch cầu nhẹ (Plagemann 1996). Sau pha cấp tính của tình trạng lây nhiễm PRRSV, mà thường được đặc trưng bởi bệnh lâm sàng và tình trạng nhiễm virus trong máu, nhiều con lợn đã hoàn toàn bình phục nhưng vẫn bị nhiễm virus với mức độ thấp trong khoảng thời gian dài. Các con lợn mang bệnh này bị nhiễm PRRSV dai dẳng và phát tán virus, hoặc theo từng đợt hoặc liên tục, và có thể lây nhiễm sang lợn chưa quen thử nghiệm sau khi tiếp xúc trực tiếp hoặc gián tiếp với virus. Trong điều kiện thử nghiệm, tình trạng bị lây nhiễm PRRSV dai dẳng đã được nêu rất rõ trong các tài liệu chuyên ngành (Albina et al., 1994; Allende et al., 2000; Benfield et al., 1998; Christopherhennings et al., 1995; Sur et al., 1996; Yoon et al.,

1993). Đặc biệt nhất là, virus lây nhiễm sẽ phục hồi trong vòng tối đa 157 ngày sau khi lây nhiễm (Wills et al., 1997). Các đại thực bào và bạch cầu đơn nhân trong mô là các tế bào đích chủ yếu trong cả tình trạng lây nhiễm cấp tính và liên tục (Molitor et al., 1997), mặc dù tế bào phổi và tế bào mầm biểu mô của các con lợn thử nghiệm cũng thể hiện rằng chúng đã bị lây nhiễm (Sur et al., 1996; Sur et al., 1997).

Tác nhân căn nguyên của PRRS là virus ARN sợi dương có vỏ, là một thành viên của họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales*. Các thành viên khác của họ *Arteriviridae* bao gồm virus làm tăng lactat dehydrogenaza (Lactate dehydrogenase-elevating virus - LDV) ở chuột nhắt, virus gây viêm động mạch trên ngựa (Equine arteritis virus -EAV), và virus gây bệnh sốt xuất huyết khỉ (Simian hemorrhagic fever virus SHFV). Phân tích về dữ liệu trình tự hệ gen không chỉ phát hiện ra độ đa dạng sâu rộng giữa các chủng PRRSV mà còn phát hiện các miền bảo toàn cao (Andreyev et al., 1997; Meng 2000; Meng et al., 1995). Tổ chức hệ gen của PRRSV là tương tự với tổ chức hệ gen của các Arterivirus khác, trong đó ARN hệ gen đóng vai trò làm ARN thông tin cho các protein ORF1a replicaza (Plagemann 1996). Các ORF1a và 1b chiếm khoảng 80% hệ gen virus và mã hóa ARN polymeraza phụ thuộc ARN cũng như các polyprotein mà được xử lý thành các protein không cấu trúc khác (Snijder và Meulenberg 1998). Bằng cách sử dụng virus Lelystad, các ORF 2-7 đã được xác định là mã hóa các protein cấu trúc của virus. Protein được mã hóa bởi ORF 5 (GP5) và M (Van Breedam et al., 2010b) có thể đóng vai trò trong việc gây ra hiện tượng làm chết tế bào theo chương trình do PRRSV (Suarez et al., 1996; Sur et al., 1997) và được cho rằng nó là protein gắn kết virus trong virus làm tăng Lactat dehydrogenaza liên quan gần nhất. Glycoprotein vỏ GP2a và GP4 chiếm một lượng nhỏ trong PRRSV tương tác với *CD163* (Das et al., 2010). Có dữ liệu gợi ý rằng sự gắn kết với *SIGLEC1* (lectin 1 tương tự Ig gắn kết với axit sialic) là cần thiết để xâm nhập vào các tế bào, và trong thực tế, sự liên kết kép với cả *SIGLEC1* và *CD163* dường như là cần thiết để lây nhiễm virus (Van Gorp et al., 2008).

Nhiều đặc tính của cả tác nhân gây bệnh PRRSV (đặc biệt là ở cấp độ phân tử) và bệnh dịch học động vật chưa được tìm hiểu rõ, do đó gây khó khăn cho các nỗ lực kiểm soát. Để tìm hiểu rõ hơn, các dòng lây nhiễm với PRRSV đã được phát triển (Nielsen et al., 2003). Ngày nay, các nhà sản xuất thường tiêm phòng cho lợn chống lại PRRSV bằng vaccin chứa chủng giảm độc lực còn sống được cải biến hoặc vaccin

chứa virus đã chết. Tuy nhiên, các vaccine hiện có thường không tạo ra tác dụng bảo vệ hiệu quả, do cả sự biến dị chủng và sự kích thích không thích hợp của hệ miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch có tác dụng bảo vệ có thể xuất hiện vì đã phát hiện ra rằng việc tiếp xúc trước với virus có thể mang lại tác dụng bảo vệ hoàn toàn khi lợn được cho thử nghiệm bằng chủng tương đồng của PRRSV (Lager et al., 1999). Tuy nhiên, chưa từng phát hiện thấy sự miễn dịch có tác dụng bảo vệ giống như vậy khi thử nghiệm bằng chủng dị tương đồng. Ngoài mối quan tâm về vấn đề hiệu quả của các vaccine PRRSV hiện có, đã có bằng chứng xác thực cho thấy rằng vaccine sống được cải biến hiện đang được sử dụng có thể sẽ tồn lưu trong từng con lợn và đàn lợn và tích tụ các đột biến (Mengeling et al., 1999), như đã được phát hiện ở chủng phân lập từ thực địa có độc tính sau khi lợn bị lây nhiễm do thử nghiệm (Rowland et al., 1999). Hơn thế nữa, đã thấy rằng virus chứa trong vaccine sẽ bị phát tán trong tinh dịch của các con lợn đực đã được tiêm phòng (Christopherhennings et al., 1997). Thay cho việc tiêm phòng, một số chuyên gia đang chủ trương chiến lược “thử nghiệm và loại bỏ” trên các đàn nhân giống (Dee và Molitor 1998). Việc áp dụng thành công chiến lược này phụ thuộc vào việc loại bỏ tất cả các con lợn đang bị nhiễm PRRSV hoặc cấp tính hoặc dai dẳng, tiếp theo kiểm soát chặt chẽ để ngăn ngừa sự tái xâm nhập của virus. Khó khăn, và phần lớn chi phí, của chiến lược này là ở chỗ người ta biết rất ít về sự phát sinh bệnh của tình trạng bị lây nhiễm PRRSV dai dẳng và do đó, không có các kỹ thuật tin cậy để xác định lợn bị lây nhiễm dai dẳng.

Thụ thể tế bào giả định đối với PRRSV đã được xác định bằng các kháng thể đơn dòng, được làm sạch và được giải trình tự (Vanderheijden et al., 2003; Wissink et al., 2003) và đặt tên là *SIGLECI*. Phân tử này tương tự với sialoadhesin và đã được thấy là nó làm trung gian cho sự xâm nhập của PRRSV vào các tế bào không nhạy cảm, nhưng dòng tế bào tái tổ hợp biểu hiện thụ thể này lại không trợ giúp cho sự sao chép sinh sản của PRRSV (Vanderheijden et al., 2003). Điều quan trọng là, đã phát hiện ra các phân tử axit sialic có mặt trên bề mặt PRRSV là cần thiết cho tình trạng bị lây nhiễm của đại thực bào phế nang. Sau khi virus liên kết với thụ thể này, PRRSV sẽ xâm nhập bằng cách thực ẩm bào qua trung gian thụ thể (Nauwynck et al., 1999). Vai trò chủ yếu của sialoadhesin đối với sự xâm nhập của PRRSV được xác lập bởi các thử nghiệm trong đó sự hấp phụ virus được thể hiện trong các tế bào PK15 (dòng tế bào không cho phép sao chép PRRSV) đã được chuyển nhiễm bằng sialoadhesin của

lợn tách dòng, nhưng không được thể hiện trong các tế bào PK15 đối chứng không chuyển nhiễm (Vanderheijden et al., 2003). Nghiên cứu khác trên cùng nhóm này đã cho thấy rằng các tương tác giữa axit sialic trên bề mặt virion PRRSV và phân tử sialoadhesin là cần thiết cho tình trạng lây nhiễm PRRSV của đại thực bào phế nang (Delputte và Nauwynck 2004). Một chiến lược ngược lại, tức là loại bỏ axit sialic trên bề mặt của PRRSV hoặc ủ sơ bộ với lectin đặc hiệu với axit sialic cũng chặn đứng tình trạng bị lây nhiễm (Delputte et al., 2004; Delputte và Nauwynck 2004; Van Breedam et al., 2010b). Độc lập với nghiên cứu đặc hiệu trên sự xâm nhập PRRSV, phép gây đột biến định hướng điểm đã được sử dụng để xác định sáu gốc axit amin thiết yếu cần thiết để axit sialic gắn kết với sialoadhesin của chuột (Vinson et al., 1996), vốn tương đồng đến 69% với sialoadhesin của lợn. Điều quan trọng là, tất cả sáu axit amin xác định được trong sialoadhesin của chuột cũng được bảo toàn trong phân tử sialoadhesin của lợn.

SIGLEC1 là thụ thể liên màng của họ lectin tương tự globulin miễn dịch gắn kết với axit sialic. Nó được mô tả lần đầu tiên như là thụ thể gắn kết hồng cầu cừu của đại thực bào chuột nhắt (Crocker và Gordon 1986). Nó được biểu hiện trên đại thực bào trong các mô tạo máu và bạch huyết. SIGLEC gồm miền V-set đầu tận cùng N chứa điểm gắn kết axit sialic, tiếp theo là một số miền C2-set, và sau đó là miền liên màng và đuôi bào chất. Trái với các SIGLEC khác, *SIGLEC1* không có motif trên cơ sở tyrosin trong đuôi bào chất (Oetke et al., 2006). Điểm gắn kết axit sialic được lập bản đồ với miền V-set tương tự globulin miễn dịch đầu tận cùng N (Nath et al., 1995). Gốc R116 dường như là một trong số các axit amin quan trọng đối với sự gắn kết axit sialic (Crocker et al., 1999; Delputte et al., 2007). Do đó, miền đầu tận cùng N nguyên vẹn vừa cần và vừa đủ để PRRSV gắn kết với *SIGLEC1* (Van Breedam et al., 2010a). Việc làm bất hoạt *SIGLEC1* đã được thông báo ở chuột nhắt và làm cho chuột nhắt sống được và sinh sản được và không thể hiện các bất thường trong khi phát triển (Oetke et al., 2006). Tuy nhiên, các con chuột nhắt này có các thay đổi tinh vi về quần thể tế bào B và T và có mức globulin miễn dịch M bị giảm.

Quá trình lây nhiễm PRRSV bắt đầu bằng sự gắn kết khởi đầu với heparan sulfat trên bề mặt đại thực bào phế nang. Sau đó, xảy ra sự gắn kết chặt chẽ với sialoadhesin (*SIGLEC1*, còn được gọi là CD169 hoặc SN). Tiếp theo, virus được nhập bào thông qua sự thực bào qua trung gian clatherin. Sau đó, một phân tử khác, *CD163*, phá vỡ

virut trong nội bào (Van Breedam et al., 2010a). Hệ gen virut được giải phóng và tế bào bị lây nhiễm.

CD163 có 17 exon và protein bao gồm vùng ngoại bào có 9 miền giàu xystein thụ thể dọn dẹp (scavenger receptor cysteine-rich -SRCR), đoạn liên màng, và đuôi bào chất ngắn. Một vài thể biến dị khác nhau tạo ra do việc phân cắt biệt hóa của gen đơn (Ritter et al., 1999a; Ritter et al., 1999b). Phần lớn biến dị này được giải thích là do độ dài của đuôi bào chất.

CD163 có nhiều chức năng quan trọng, bao gồm sự hoạt động như một thụ thể dọn dẹp haptoglobin-hemoglobin. Việc loại bỏ hemoglobin tự do trong máu là chức năng quan trọng của *CD163* vì nhóm heme có thể rất độc (Kristiansen et al., 2001). *CD163* có đuôi bào chất tạo điều kiện thuận lợi cho thực ẩm bào. Việc gây đột biến đuôi này dẫn đến sự hấp thu phức haptoglobin-hemoglobin bị giảm (Nielsen et al., 2006). Chức năng khác của *CD163* bao gồm sự bám dính nguyên hồng cầu (SRCR2), làm thụ thể TWEAK (SRCR1-4 & 6-9), thụ thể vi khuẩn (SRCR5), thụ thể virut lợn châu Phi (Sanchez-Torres et al., 2003), và vai trò tiềm ẩn là làm chất điều biến miễn dịch (được bàn luận trong tài liệu chuyên ngành (Van Gorp et al., 2010a)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và/hoặc ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt, được tạo ra theo phương pháp bao gồm bước rút nhân của noãn bào lợn; dung hợp noãn bào này với tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của tế bào nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt; và hoạt hóa noãn bào này để tạo ra phôi.

Sáng chế còn đề xuất lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), được tạo ra theo phương pháp bao gồm bước rút nhân noãn bào lợn; dung hợp noãn bào này với tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của tế bào nguyên bào

sợi này chứa ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; và hoạt hóa noãn bào này để tạo ra phôi.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt, được tạo ra theo phương pháp bao gồm bước cho lợn đực được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn cái được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, được tạo ra theo phương pháp bao gồm bước cho lợn đực được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với lợn cái được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số ba phương pháp. Phương pháp thứ nhất bao gồm việc cho lợn được biến đổi gen có ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn được biến đổi gen có ít nhất một alen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt. Phương pháp này còn bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với nhau để tạo ra thế hệ con F2 và sàng lọc thế hệ con F2 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Phương pháp thứ hai bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, cho thế hệ con F1 giao phối để tạo ra thế hệ con F2, và sàng lọc thế hệ con F2 để xác định lợn được cải

biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Phương pháp thứ ba bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với lợn khác được cải biến gen khác trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất thế hệ con bất kỳ của lợn được cải biến gen nêu trên, trong đó: (1) ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt; (2) ít nhất trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; (3) ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; hoặc (4) cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt. Trong thế hệ con này, một hoặc cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, việc làm bất hoạt khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt. Phương pháp này bao gồm bước rút nhân noãn bào của lợn; dung hợp noãn bào này với tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của tế bào nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt; và hoạt hóa noãn bào này để tạo ra phôi.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Phương pháp này bao gồm bước rút nhân noãn bào của lợn; dung hợp noãn bào này với tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của tế bào nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *CD163* bị làm bất hoạt; và hoạt hóa noãn bào này để tạo ra phôi.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt. Phương pháp này bao gồm bước cho lợn cái được cải biến gen có ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn đực được cải biến gen có ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1,

và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ PRRSV. Phương pháp này bao gồm bước cho lợn cái được cải biến gen có ít nhất một alen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với lợn đực được cải biến gen có ít nhất một alen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Phương pháp này bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen có ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn được biến đổi gen có ít nhất một alen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt. Phương pháp này còn bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với nhau để tạo ra thế hệ con F2 và sàng lọc thế hệ con F2 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp khác để tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt gen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Phương pháp này bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, cho giao phối thế hệ con F1 để tạo ra thế hệ con F2, và sàng lọc thế hệ con F2 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp khác để tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt gen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Phương pháp này bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với lợn khác được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1, và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thế hệ con của lợn được cải biến gen đã được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, trong đó một hoặc cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và/hoặc trong đó một hoặc cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Các mục đích và dấu hiệu khác sẽ được làm rõ một phần và được mô tả một phần dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 mô tả tổ chức của gen sialoadhesin và thiết kế vector hướng đích. Hình 1A và Hình 1B là các biểu đồ thể hiện rằng các gen sialoadhesin của người (Hình 1A) và chuột nhắt (Hình 1B) lần lượt được cấu thành bởi 21 exon và kéo dài khoảng 20kb. Hình 1C thể hiện các phân tích đột biến của chuột trên exon 2 (trình tự ADN của exon 2 như được thể hiện trên Hình 1C là SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin được mã hóa bởi exon 2 như được thể hiện trên Hình 1C là SEQ ID NO: 8). Phân tích đột biến này bộc lộ 6 axit amin để gắn kết sialoadhesin với phối tử (được thể hiện bằng phần chữ in đậm/đóng khung). Hình 1D mô tả thiết kế vector hướng đích được sử dụng để thay thế một phần của exon 1 và các exon 2 và 3 của *SIGLEC1* bằng mã kết thúc. Vector này còn chứa catxet chọn lọc neomycin (neo) bị kích thích bởi đoạn khởi đầu PGK.

Hình 2 thể hiện thiết kế vector hướng đích, tổ chức của gen sialoadhesin, và tổ chức của gen sialoadhesin biến đổi.

Hình 3 là ảnh chụp của gel thể hiện phép sàng lọc PCR để xác định sự hướng đích của gen sialoadhesin.

Hình 4 là ảnh chụp của gel thể hiện phép sàng lọc PCR để xác định sự có mặt đồng đều của cả sialoadhesin kiểu dại và alen hướng đích.

Hình 5 thể hiện tổ chức miền cấu trúc của *CD163* kiểu dại (phía bên trái) chứa 9 miền ngoại bào SRCR, 2 miền giàu prolin, serin, và threonin (PST), vùng liên màng và đuôi bào chất nội bào. *CD163* được cải biến gen được thể hiện ở phía bên phải. Tổ chức miền cấu trúc vẫn giống như cũ chỉ khác là miền SRCR 5 đã được thay thế bằng miền SRCR 8 thu được từ phôi tử *CD163* (*CD163L*).

Hình 6 thể hiện vector hướng đích *CD163*, trong đó các nhánh của vector này là đoạn cắt của ADN mà có trình tự giống hệt với *CD163* có trong tự nhiên hoặc kiểu dại, do đó cho phép vector này ghép với *CD163* đã có mặt trong các tế bào. Sau đó, ADN cải biến nằm giữa hai nhánh của *CD163* có thể được chèn vào ADN tế bào bằng phép tái tổ hợp tương đồng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

“Lợn bất hoạt” là lợn được biến đổi gen, trong đó chức năng của một hoặc cả hai alen của gen bị biến đổi, ví dụ, loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn gen. Nếu một alen của gen bị làm bất hoạt, lợn này dị hợp đối với sự bất hoạt gen đó; nếu cả hai alen bị làm bất hoạt, thì lợn này đồng hợp đối với sự bất hoạt gen.

Thuật ngữ “tế bào cho” được dùng để chỉ tế bào mà từ đó, lấy được chất liệu nhân hoặc chromatin, để sử dụng trong việc chuyển nhân. Như được bàn luận trong bản mô tả này, quá trình chuyển nhân có thể bao gồm việc chuyển chỉ nhân hoặc chromatin như phân lập được từ tế bào cho, hoặc việc chuyển toàn bộ tế bào cho kể cả chất liệu nhân hoặc chromatin như vậy.

Thuật ngữ “biến đổi gen” được dùng để chỉ một hoặc nhiều sự biến đổi trong trình tự gen (bao gồm các trình tự ghi mã và trình tự không ghi mã, như intron, trình tự khởi đầu, và các trình tự không dịch mã ở đầu 5’ và 3’) làm thay đổi sự biểu hiện hoặc hoạt tính của gen. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, chèn (ví dụ, trình tự dị tương đồng, như thành phần đánh dấu chọn lọc và/hoặc các tín hiệu ngoài cùng), loại bỏ, đột biến

dịch khung, đột biến không dịch nghĩa, đột biến sai nghĩa, đột biến điểm, hoặc tổ hợp của chúng.

Thuật ngữ “tế bào nhận” được dùng để chỉ tế bào mà tế bào cho, nhân của tế bào cho, hoặc chromatin của tế bào cho được đưa vào. Tế bào nhận được rút nhân theo cách thích hợp trước khi chuyển nhân. Các ví dụ về tế bào nhận bao gồm noãn bào, hợp tử, và các tế bào của phôi hai tế bào.

“ARN can thiệp nhỏ” (viết tắt là siARN) được dùng để chỉ các phân tử ARN sợi đôi có khả năng can thiệp đặc hiệu vào sự biểu hiện protein. Các ARN can thiệp nhỏ thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 10 nucleotit đến 30 nucleotit. Chiều dài của phân tử ARN can thiệp nhỏ dựa trên cơ sở chiều dài của sợi không mã hóa của phân tử ARN can thiệp nhỏ.

Mô tả các phương án ưu tiên

Sáng chế đề xuất lợn được cải biến gen kháng lại tình trạng nhiễm virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản của lợn (PRRSV). Sự lây nhiễm PRRSV có nguyên nhân là từ ba thực thể trung gian cho sự xâm nhập đặc hiệu: (1) gắn kết khởi đầu với heparan sulfat, (2) gắn kết/ nhập bào nhờ sialoadhesin (*SIGLEC1*), và (3) nhập bào/phá vỡ của virus nhờ *CD163*. Do đó, việc ngăn ngừa tương tác giữa PRRSV và *SIGLEC1* và/hoặc PRRSV và *CD163* dẫn đến việc làm mất khả năng của PRRSV là thiết lập tình trạng bị lây nhiễm ở vật chủ. Vì vậy, sáng chế đề xuất lợn được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và/hoặc trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV). Các lợn này cũng có thể được gọi là lợn có gen *SIGLEC1* và/hoặc *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế bao gồm lợn, trong đó chỉ một alen của gen hướng đích (*SIGLEC1* và/hoặc *CD163*) bị làm bất hoạt, trong khi alen khác vẫn không bị ảnh hưởng. Các con lợn, mà ở đây gọi là lợn “dị hợp” hoặc “bán hợp” có thể được sử dụng trong cách nhân giống để tạo ra sự đột biến đồng hợp. Trong phạm vi của sáng chế là lợn đột biến đồng hợp, trong đó cả hai alen của gen đích bị làm bất hoạt, hoặc bằng cùng hoặc bằng các cách khác nhau. Do đó, sáng chế bao gồm lợn được cải biến gen, trong đó: (1) một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt; (2) một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt;

(3) cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt; (4) cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; (5) cả hai alen của gen *SIGLEC1* và một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; (6) một alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; (7) một alen của gen *SIGLEC1* và một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; hoặc (8) cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt. Trong mỗi trường hợp và trong phạm vi yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế này, thông thường, việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Việc hướng đích gen được thực hiện để tạo ra lợn theo sáng chế có thể gây ra sự bất hoạt gen bằng cách ngắt quãng, loại bỏ, cải biến, hoặc thay thế trình tự gen đích. Phương pháp làm bất hoạt gen là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, gen đích có thể bị làm bất hoạt bằng cách chèn trình tự dị tương đồng (như thành phần đánh dấu chọn lọc và/hoặc mã kết thúc) vào gen đích, loại bỏ phần của gen hoặc toàn bộ gen, cải biến gen (ví dụ, bằng cách đột biến dịch khung, đột biến không dịch nghĩa, đột biến sai nghĩa, đột biến điểm, thay thế một phần hoặc toàn bộ gen bằng trình tự axit nucleic khác), hoặc tổ hợp bất kỳ trong số các cách này.

Các trình tự được chèn có thể thay thế các trình tự đã có từ trước trong gen hoặc có thể được bổ sung vào các trình tự này, phụ thuộc vào thiết kế của sản phẩm thiết kế hướng đích. Thiết kế của sản phẩm thiết kế hướng đích có thể biến đổi, phụ thuộc vào việc có muốn làm bất hoạt hoàn toàn chức năng của gen hoặc để duy trì chức năng ở mức độ giảm. Trong trường hợp *SIGLEC1*, việc làm bất hoạt hoàn toàn chức năng là được mong muốn. Bằng cách làm ví dụ và không nhằm đặt ra giới hạn, gen *SIGLEC1* có thể bị làm bất hoạt bằng cách loại bỏ một phần exon 1 và tất cả các exon 2 và 3, ví dụ, bằng cách thay thế một phần exon 1 và cả exon 2 và 3 bằng catxet chọn lọc neomycin. Theo một số phương án, việc cải biến còn có thể bao gồm việc bổ sung các điểm LoxP trên hoặc bên cạnh trình tự của gen *SIGLEC1* cần đột biến. Trong một số trường hợp, sản phẩm thiết kế hướng đích có thể chứa cả hai điểm loxP nằm bên sườn trình tự được chèn vào và recombinaza CRE. Trong các trường hợp khác, hệ hai vật truyền có thể được sử dụng, trong đó sản phẩm thiết kế hướng đích bao gồm các điểm loxP nằm bên sườn trình tự được chèn vào và vectơ thứ hai chứa gen chuyển ghi mã đối với recombinaza CRE. Gen chuyển đối với recombinaza CRE có thể bị chịu tác động của đoạn khởi đầu đặc hiệu mô, sao cho biểu hiện của nó làm cho gen *SIGLEC1*

không hoạt động trên các dòng tế bào đặc hiệu. Tương tự, catxet chọn lọc kháng sinh có thể có các điểm loxP nằm bên sườn sao cho catxet này có thể được loại bỏ trong giai đoạn sau bằng cách sử dụng recombinaza Cre.

Trong trường hợp *CD163*, nên chỉ làm bất hoạt chức năng liên quan đến sự gắn kết và/hoặc phá vỡ PRRSV trong khi các chức năng khác của *CD163* chỉ bị ảnh hưởng ở mức tối thiểu hoặc không bị ảnh hưởng. Trong khi không bị ràng buộc vào lý thuyết cụ thể bất kỳ, tin rằng việc làm bất hoạt hoàn toàn *CD163* có thể không thực hiện được hoặc có thể bị tổn hại nghiêm trọng do vai trò của *CD163* trong sự gắn kết và đưa phức haemoglobin-haptoglobin nhập bào. Do đó, *CD163* có thể bị làm bất hoạt bằng cách phá vỡ miền giàu xystein thụ thể dọn dẹp (SRCR) đầu tận cùng N thứ năm của *CD163*, vốn đã được biết trước là đóng vai trò dẫn đầu trong tình trạng bị lây nhiễm PRRSV (Van Gorp et al., 2010), trong khi các miền khác không bị ảnh hưởng. Miền SRCR 5 có thể được cải biến gen, ví dụ, bằng cách gây đột biến điểm làm thay đổi cấu trúc của miền này vào hoặc bằng cách đổi miền này với miền khác. Ví dụ, miền SRCR 5 có thể được thay thế bằng miền SRCR 8 từ phôi tử *CD163* (*CD163L*) vì việc “đổi” miền này đã cho thấy là làm giảm mức lây nhiễm PRRSV tương đối đến 0% trong các tế bào được nuôi cấy (Van Gorp et al., 2010).

Theo cách khác, các trình tự ghi mã đối với gen đích không bị biến đổi hoặc biến đổi ở mức tối thiểu và, đúng hơn là, các trình tự ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen đích, như trình tự khởi đầu, được hướng đích. Trong mọi trường hợp, việc chèn thành phần đánh dấu chọn lọc thường được mong muốn để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định các tế bào trong đó sự hướng đích đã xảy ra. Nếu muốn, các thành phần đánh dấu này hoặc các trình tự được chèn khác có thể được loại ra sau đó, ví dụ, bằng Cre-Lox hoặc hệ tương tự.

Việc biến đổi gen hướng đích sử dụng cấu trúc axit nucleic có các vùng tương đồng với gen đích (ví dụ, *SIGLEC1* hoặc *CD163*) hoặc với các vùng bên sườn của gen đích, sao cho sự gắn cấu trúc vào hệ gen này làm thay đổi sự biểu hiện của gen, hoặc bằng cách thay đổi trình tự của gen và/hoặc làm thay đổi mức biểu hiện của gen. Do đó, để làm thay đổi gen, sản phẩm thiết kế hướng đích thường được thiết kế để chứa ba vùng chính: (i) vùng thứ nhất tương đồng với locus cần hướng đích (ví dụ, gen *SIGLEC1* hoặc *CD163*, hoặc trình tự bên sườn của chúng), (ii) vùng thứ hai là trình tự polynucleotit dị tương đồng (ví dụ, ghi mã thành phần đánh dấu chọn lọc, như protein

kháng kháng sinh) để thay thế đặc hiệu cho một phần của locus hướng đích hoặc được chèn vào locus hướng đích, và (iii) vùng thứ ba, giống như vùng thứ nhất, tương đồng với locus hướng đích, nhưng thường không liền kề với vùng thứ nhất của cấu trúc. Việc tái tổ hợp tương đồng giữa sản phẩm thiết kế hướng đích và locus kiểu đại hướng đích dẫn đến việc loại bỏ các trình tự locus bất kỳ giữa hai vùng tương đồng có mặt trong vector hướng đích và thay thế trình tự đó bằng, hoặc chèn vào trình tự đó, trình tự dị tương đồng (ví dụ, trình tự dị tương đồng mã hóa thành phần đánh dấu chọn lọc). Cấu trúc và vector làm ví dụ để thực hiện phép cải biến hướng đích này được bộc lộ trong Ví dụ 1; tuy nhiên, các vector khác có thể được sử dụng trong cách này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được dễ dàng làm thích ứng để sử dụng trong sáng chế.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tái tổ hợp tương đồng, các vùng thứ nhất và thứ ba của vector hướng đích (xem trên đây) bao gồm các trình tự biểu hiện mức độ tương đồng trình tự đáng kể với gen cần hướng đích (hoặc vùng bên sườn). Ví dụ, các vùng thứ nhất và thứ ba của vector hướng đích có thể có các trình tự tương đồng ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 98%, ít nhất khoảng 99%, hoặc khoảng 100% với gen hướng đích hoặc vùng bên sườn. Mức độ tương đồng trình tự thường được đo bằng cách sử dụng BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool -Công cụ so sánh trình tự cơ bản tại chỗ) hoặc BLAST® 2 với các thông số đặc hiệu ngầm định trong đó (xem bài báo: Altschul et al, J. Mol. Biol. 215 :403-410, 1990; Tatiana et al, FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250, 1999). Do đó, các trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 98%, ít nhất khoảng 99%, hoặc thậm chí khoảng 100%) với các gen locus hướng đích có thể được sử dụng trong sáng chế để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tái tổ hợp tương đồng.

Tổng kích thước của hai vùng tương đồng (tức là vùng thứ nhất và thứ ba nêu trên) có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 2 kilobazơ (kb) đến 25kb (ví dụ, nằm trong khoảng từ 4kb đến 20kb, nằm trong khoảng từ 5kb đến 15kb, hoặc nằm trong khoảng từ 6kb đến 10kb). Kích thước của vùng thay thế cho một phần locus hướng đích hoặc được chèn vào vào locus hướng đích (vùng thứ hai như nêu trên) có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,5kb đến 5kb (ví dụ, nằm trong khoảng từ 1kb đến 4kb hoặc nằm trong khoảng từ 3kb đến 4kb).

Các kiểu phương pháp khác để phân phối sản phẩm thiết kế hướng đích có thể được sử dụng. Các phương pháp chuyển nhiễm tế bào, bao gồm phương pháp sử dụng canxi phosphat, lipofection, đục lỗ bằng xung điện, và tiêm nhân có thể được sử dụng để phân phối sản phẩm thiết kế hướng đích. Nếu gen này có hoạt tính phiên mã trong kiểu tế bào được sử dụng, thì chiến lược thành phần đánh dấu chọn lọc không sử dụng đoạn khởi đầu có thể được sử dụng, sao cho sự kháng kháng sinh chỉ được tìm thấy trong các tế bào mà có hiện tượng tái tổ hợp bên trong đơn vị phiên mã. Theo cách khác, nếu gen có hoạt tính phiên mã trong kiểu tế bào được sử dụng, các chất khởi đầu nhạy cảm, đặc hiệu mô hoặc chứa thành phần cách ly như vùng gắn kết nền (matrix attachment regions -MARs) có thể được sử dụng.

Theo cách khác, kỹ thuật ARN can thiệp nhỏ có thể được sử dụng để “gây câm” sự phiên mã đối với *SIGLEC1*. Kỹ thuật không dịch mã là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một cách vắn tắt, trình tự nucleotit thường chứa từ 19 nucleotit đến 29 nucleotit hỗ trợ cho trình tự ARN thông tin dịch mã của *SIGLEC1* được sử dụng. Mức độ hỗ trợ thông thường nằm trong khoảng từ 70% đến 100%. Tốt hơn, nếu mức độ hỗ trợ lớn hơn đến khoảng 80%, tốt hơn nữa lớn hơn đến khoảng 90%, và tốt hơn nữa là lớn hơn đến khoảng 95%. Các vùng của *SIGLEC1* ARN thông tin thích hợp để hướng đích bằng ARN can thiệp nhỏ có thể dễ dàng được xác định bằng cách so sánh hiệu quả của vài trình tự không mã hóa được thiết kế để hỗ trợ cho các vùng khác nhau của ARN thông tin *SIGLEC1* để ngăn ngừa sự tạo ra protein *SIGLEC1*. Các thử nghiệm này có thể được dễ dàng thực hiện mà không cần thử nghiệm quá mức bằng bất kỳ trong số các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các vector dùng để biểu hiện ARN can thiệp nhỏ là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vector này có thể là ADN vòng hoặc thẳng có chiều dài bất kỳ tích hợp vào hệ gen của vật chủ hoặc được duy trì ở dạng episom. Nói chung, catxet biểu hiện ARN can thiệp nhỏ có thể được gắn vào vật truyền chuyển ADN, như plasmit, hoặc lentivirus, adenovirus, alphavirus, retrovirus hoặc vector virus khác. Hệ vật truyền virus động vật có vú để làm ví dụ bao gồm vector adenovirus; các vector virus liên kết adeno typ 1 (adeno-associated virus typ 1 -“AAV-1”) hoặc typ 2 (“AAV-2”); vector virus viêm gan delta; virus delta có độc lực giảm, sống; các vector virus herpes; vector alphavirus; hoặc các vector retrovirus (kể cả vector lentivirus).

Việc biến nạp tế bào động vật có vú có thể được thực hiện theo các kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Quy trình bất kỳ trong số các quy trình đã được biết rõ để đưa các trình tự nucleotit ngoại lai vào tế bào chủ có thể được sử dụng chừng nào chúng đưa thành công ít nhất cấu trúc ARN can thiệp nhỏ vào tế bào chủ. Các quy trình này bao gồm bước áp dụng sự tải nạp virus (ví dụ, bằng cách sử dụng vectơ bất kỳ trong số các vectơ virus được liệt kê trong đoạn nêu trên, ví dụ, bằng cách gây nhiễm retrovirus, tùy ý với sự có mặt của polybren để làm gia tăng hiệu quả gây nhiễm), chuyển nhiễm canxi phosphat, đục lỗ bằng xung điện, hệ thống phân phối phân tử gen (nghĩa là súng bắn gen), liposom, vi tiêm, và phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết khác để đưa ADN hệ gen tách dòng, ADN bổ trợ, ADN tổng hợp hoặc chất liệu gen ngoại sinh khác vào tế bào chủ. Theo sáng chế, ARN can thiệp nhỏ được hướng đối với *SIGLEC1* được đưa vào các tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, được sử dụng tiếp để tạo ra lợn được cải biến chuyển gen theo sáng chế.

Lợn chuyển gen theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách áp dụng quy trình chuyển nhân dưỡng bào tổng quát. Một cách vắn tắt, hệ gen của dưỡng bào lợn (ví dụ, nguyên bào sợi thai) được cải biến gen bằng cách hướng đích gen như nêu trên, để tạo ra tế bào cho. Sau đó, nhân của tế bào cho được biến đổi gen này (hoặc toàn bộ tế bào cho, kể cả nhân) được chuyển vào tế bào nhận, ví dụ, noãn bào đã được rút nhân. Tế bào cho có thể được dung hợp với noãn bào rút nhân, hoặc nhân cho hoặc chính tế bào cho có thể được tiêm vào các tế bào nhận hoặc được tiêm vào vùng quanh noãn hoàng, bên cạnh màng noãn bào.

Do đó, khi thu dưỡng bào, trong đó gen đích đã được hướng đến (một hoặc cả hai alen, như nêu trên), quá trình chuyển nhân có thể được thực hiện. Tùy ý, tế bào cho được cải biến gen có thể được bảo quản bằng cách đóng băng trước khi chuyển nhân. Tế bào nhận có thể được sử dụng bao gồm noãn bào, hợp tử thụ tinh, hoặc các tế bào của phôi hai tế bào, tất cả có thể được rút nhân hoặc có thể không.

Noãn bào nhận có thể thu được bằng cách áp dụng các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc có thể mua được từ các nguồn thương mại (ví dụ, từ BoMed Inc., Madison, Wis.). Noãn bào có thể thu được từ “lợn nái con”, lợn cái chưa sinh con hoặc từ “lợn nái trưởng thành”, lợn cái đã sinh con.

Do đó, lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt có thể được tạo ra bằng cách rút nhân noãn bào của lợn; dung hợp noãn bào này với tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của tế bào nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt; và hoạt hóa noãn bào này để tạo ra phôi. Tương tự, lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) có thể được tạo ra bằng cách rút nhân noãn bào của lợn; dung hợp noãn bào này với tế bào nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của tế bào nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *CD163* bị làm bất hoạt; và hoạt hóa noãn bào này để tạo ra phôi. Cả hai phương pháp này còn có thể bao gồm bước chuyển phôi vào đường sinh sản của lợn thay thế, trong đó lợn thay thế đã được gây động dục nhưng chưa hoàn tất việc rụng trứng; và trong đó kỳ mang thai và kỳ sinh nở phôi này sẽ tạo ra lợn được biến đổi gen có hệ gen chứa ít nhất một alen *SIGLEC1* và/hoặc *CD163* bị làm bất hoạt. Sáng chế còn đề xuất thế hệ con của lợn được cải biến gen này, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt, và/hoặc trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Các phương pháp rút nhân noãn bào lợn là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và việc rút nhân có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp tiêu chuẩn. Ví dụ, việc rút nhân noãn bào có thể được thực hiện bằng micropipet trong môi trường vi thao tác.

Việc đưa nhân liên kết màng từ tế bào cho của lợn vào noãn bào lợn nhận đã được rút nhân để tạo ra noãn bào chứa nhân cho có thể được thực hiện bằng cách dung hợp màng của nhân liên kết màng của tế bào động vật có vú cho với màng của noãn bào đã được rút nhân của động vật có vú nhận để tạo ra noãn bào chứa nhân của tế bào động vật có vú cho. Theo cách khác, việc đưa vào này có thể được thực hiện bằng cách vi tiêm nhân liên kết màng của tế bào động vật có vú cho vào noãn bào đã được rút nhân của động vật có vú nhận để tạo ra noãn bào chứa nhân của tế bào động vật có vú cho. Ví dụ, có thể đưa tế bào cho (hoặc nhân) vào khoang bên dưới vùng sáng hoặc vào vùng quanh noãn hoàng của noãn bào nhận đã được rút nhân, và sau đó dung hợp màng để tạo ra noãn bào chứa nhân cho bên trong bào chất. Tất cả các cách để đưa

chất liệu nhân cho vào noãn bào đã được rút nhân của động vật có vú nhận mà chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết có thể được dùng trong các phương pháp đã được bộc lộ trong bản mô tả này.

Ví dụ, bước dung hợp có thể được thực hiện trong môi trường dung hợp. Theo cách khác, virus bị làm bất hoạt hoặc tác nhân dung hợp như polyetylen glycol (PEG) có thể được sử dụng để thúc đẩy sự dung hợp. Ví dụ, xem bài báo: Graham (1969) *Wistar Inst. Symp. Monogr.* 9:19-33, và McGrath et al., (1983) *Science* 220:1300-1302 về việc sử dụng virus; Fisher et al., (1981) *Tech. Cell. Physiol.* 1:1-36 về việc dung hợp tế bào bằng hóa học; và Berg (1982) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 9:223-228, và Robl et al., (1987) *J. Anim. Sci.* 64:642-647 về việc dung hợp tế bào bằng điện.

US 6,211,429 B1, nội dung của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, mô tả các phương pháp *in vitro* và *in vivo* để phát triển noãn bào được hoạt hóa. Thuật ngữ “hoạt hóa” hoặc “kích hoạt” được dùng để chỉ khả năng phát triển của noãn bào không thụ tinh đến ít nhất giai đoạn tiền nhân, hoặc sau nữa, sau khi xử lý bằng chất điều chỉnh noãn bào và tác nhân khử. Nói chung, giai đoạn tiền nhân sẽ đạt được trong khoảng thời gian từ ba đến bảy giờ sau khi xử lý. Thuật ngữ “chất điều chỉnh noãn bào” được dùng để chỉ tác nhân mà có thể phản ứng với cơ chất trên hoặc trong noãn bào, ví dụ, nhóm thiol (-SH), mà có thể là nhóm protein thiol; tác động của phản ứng này, khi bước tiếp theo là xử lý noãn bào bằng tác nhân khử theo các phương pháp đã được bộc lộ trong US 6,211,429 B1, làm hoạt hóa noãn bào của động vật có vú.

Việc sử dụng kết hợp -SH hoặc chất điều chỉnh noãn bào như thimerosal và tác nhân khử -SH như dithiothreitol có khả năng hoạt hóa hoàn toàn noãn bào của động vật có vú. Việc kết hợp bước xử lý ngắn bằng thimerosal và chỉ thoáng qua canxi đơn thuần trước khi xử lý bằng tác nhân khử như DTT là đặc biệt có hiệu quả trong việc hoạt hóa. Thimerosal gây ra một loạt cụm Ca^{2+} ở noãn bào của động vật có vú, mà khi ủ tiếp với tác nhân khử như DTT có thể kích thích sự tạo ra tiền nhân. Do đó, sau khi thimerosal bị loại bỏ, sau đó DTT được bổ sung vào để đảo ngược hoạt động của thimerosal, tiếp theo loại bỏ nó để cho phép phôi tiếp tục phát triển. Việc xử lý bằng thimerosal/DTT kết hợp cũng gây ra sự xuất bào hạt vỏ, tiếp theo làm cứng vùng sáng, và phát triển noãn bào đã được hoạt hóa đến giai đoạn túi phôi.

Ngoài thimerosal, chất điều chỉnh noãn bào khác có thể được sử dụng, như t-butyl hydroperoxit; thioure; phenylephrin; N-aklylmaleimit như N-etylmaleimit; glutathion đã được oxy hóa; alpha-haloaxit như iodoaxetat, cloaxetat, và bromoaxetat; iodoaxetamit; p-thủy ngân benzoat; p-clo thủy ngân benzoat; 5,5'-đithiobis(axit 2-nitrobenzoic) (DTNB); (2-trimetylamon)etylmetanthiosulfonat (MTSET); và (2-sulfonatoetyl)metanthiosulfonat (MTSES). Ngoài DTT, các tác nhân khử hữu dụng, như các tác nhân khử nhóm thiol (-SH), bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đithioerytritol (DTE); beta-mercaptoetanol; xystein; glutathion đã được khử; thioure đã được khử; thioglycolat; và axit ascorbic.

Khoảng thời gian trong khi noãn bào tiếp xúc với chất điều chỉnh noãn bào là thời gian hữu hiệu để gây ra việc hoạt hóa noãn bào khi tiếp theo là bước xử lý bằng tác nhân khử. Khoảng thời gian này có thể nằm trong khoảng từ 5 phút đến 20 phút, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 phút đến 15 phút, hoặc tốt hơn nữa, nếu nằm trong khoảng từ 5 phút đến 12 phút. Thời gian trong khi noãn bào tiếp xúc với tác nhân khử là đủ dài để gây ra hoạt hóa noãn bào khi đã được xử lý trước bằng chất điều chỉnh noãn bào. Khoảng thời gian này có thể nằm trong khoảng từ 5 phút đến 1 giờ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10 phút đến 45 phút, tốt hơn nữa nằm trong khoảng từ 20 phút đến 40 phút, và còn tốt hơn nữa là khoảng 30 phút.

Việc tiếp xúc của noãn bào đã được rút nhân với tác nhân khử sau khi cho tiếp xúc với chất điều chỉnh noãn bào có thể xảy ra hầu như ngay lập tức, hoặc có thể xảy ra trong khoảng thời gian nằm trong khoảng từ 5 giây đến 5 phút sau khi noãn bào tiếp xúc với chất điều chỉnh noãn bào. Noãn bào đã được xử lý bằng chất điều chỉnh noãn bào có thể được chuyển vào môi trường chứa tác nhân khử mà không có bước loại bỏ chất trung gian. Theo cách khác, noãn bào đã được xử lý bằng chất điều chỉnh noãn bào có thể được rửa trong môi trường đối chứng hoặc môi trường chứa chất khử để loại bỏ hầu hết chất điều chỉnh noãn bào trước khi nuôi cấy noãn bào trong môi trường chứa chất khử. Theo cách khác, tác nhân khử có thể được bổ sung một cách trực tiếp vào noãn bào trong khi noãn bào vẫn có mặt trong môi trường chứa chất điều chỉnh noãn bào.

Theo cách khác, việc hoạt hóa noãn bào cũng có thể được thực hiện bằng nhiều phép xử lý hóa học khác không sử dụng canxi, ví dụ, ức chế protein kinaza (Mayes et

al., (1995) *Biol. Reprod.* 53:270-275), hoặc ức chế quy trình tổng hợp protein (Nussbaum et al., (1995) *Mol. Reprod. Dev.* 41:70-75).

Sau khi hoạt hóa, noãn bào thường được nuôi cấy trong một thời gian ngắn *in vitro*. Sau đó, phôi thu được sẽ được chuyển vào lợn cái thay thế, và phôi sẽ phát triển trong lợn cái thay thế này. Ví dụ, phôi được nuôi cấy trong khoảng một tuần, và sau đó được chuyển bằng cách phẫu thuật hoặc bằng cách không phẫu thuật đến đường sinh sản của lợn thay thế. Phôi có thể được chuyển vào ống dẫn trứng thông qua tua buồng trứng của lợn thay thế. Theo cách khác, phôi có thể được chuyển vào ống dẫn trứng của lợn thay thế bằng cách sử dụng ống thông xuyên qua thành của ống dẫn trứng. Cách khác để chuyển phôi bao gồm việc nuôi cấy chúng đến giai đoạn túi phôi, tiếp theo là đưa vào đường sinh sản của lợn thay thế. Các phương pháp này là đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và có thể dễ dàng được áp dụng để tạo ra lợn được biến đổi gen theo sáng chế.

Các phương pháp khác để tạo ra lợn và động vật lớn khác được cải biến gen là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và cũng có thể được sử dụng trong sáng chế (xem: ví dụ US 2005/0120400 A1; U.S. Pat. No. 5,995,577; WO 95/16670; WO 96/07732; WO 97/00669; WO 97 00668; WO 2005/104835; Lai et al., *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:82, 2003; Hao et al., *Transgenic Res.* 15:739-750, 2006; Li et al., *Biology of Reproduction* 75:226-230, 2006; Lai et al., *Nature Biotechnology* 24(4):435-436, 2006; Lai et al., *Methods in Molecular Biology* 254(2):149-163, 2004; Lai et al., *Cloning and Stem Cells* 5(4):233-241, 2003; Park et al., *Animal Biotechnology* 12(2):173-181, 2001; Lai et al., *Science* 295:1089-1092, 2002; Park et al., *Biology of Reproduction* 65:1681-1685, 2001; nội dung của từng tài liệu được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các phương pháp khả thi khác để sản xuất lợn được cải biến gen bao gồm bước tiêm hoặc tải nạp nucleaza (nucleaza lõi kẽm, hoặc Tal nucleaza hướng đích đến gen cần quan tâm) vào dưỡng bào, tiếp theo chuyển nhân dưỡng bào và chuyển phôi vào lợn thay thế. Ngoài ra, việc biến đổi gen nhờ tinh trùng- hoặc tiêm tinh trùng vào nội bào (intracytoplasmic sperm injection -ICSI) cũng có thể được áp dụng. Một cách vắn tắt, trong việc cải biến qua trung gian tiêm tinh trùng vào nội bào ICSI, sản phẩm thiết kế hướng đích được trộn với tinh trùng, và cả hai được tiêm vào noãn bào. Trong việc cải biến nhờ tinh trùng, cấu trúc được trộn với tinh trùng, và bước thụ tinh *in vitro*

(IVF – *in vitro* fertilization) hoặc thụ tinh nhân tạo được sử dụng để thụ thai lợn thay thế. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng điều chỉnh các phương pháp này để tạo ra lợn có gen bị làm bất hoạt theo sáng chế. Mặc dù không được phát triển đầy đủ đối với lợn, kỹ thuật tế bào gốc phôi, hoặc tạo ra các tế bào tủy, như đã được phát triển đối với chuột nhắt, có thể được cải biến gen và được sử dụng làm tế bào cho để chuyển nhân dưỡng bào hoặc để sản xuất động vật khảm.

Như nêu trên, sáng chế còn đề xuất lợn được cải biến gen, trong đó (1) cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt, (2) cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỏ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), hoặc (3) cả hai alen của *SIGLEC1* và cả hai alen của *CD163* bị làm bất hoạt. Lợn được cải biến gen đồng hợp đối với sự bất hoạt gen có thể được tạo ra bằng cách cho lợn dị hợp đối với sự bất hoạt gen giao phối, và sàng lọc thế hệ con để xác định lợn đồng hợp đối với sự bất hoạt gen. Sáng chế còn đề xuất thế hệ con của lợn được cải biến gen này, trong đó một hoặc cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và/hoặc trong đó một hoặc cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt alen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỏ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt bằng cách cho lợn cái được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của *SIGLEC1* bị làm bất hoạt giao phối với lợn đực được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của *SIGLEC1* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1; và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt. Tương tự, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt bằng cách cho lợn cái được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với lợn đực được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1; và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp tạo ra lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt. Phương pháp này bao gồm bước cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen

SIGLEC1 bị làm bất hoạt giao phối với lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1; sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt; cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối nhau để tạo ra thế hệ con F2; và sàng lọc thế hệ con F2 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Các phương pháp tạo ra lợn được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của *SIGLEC1* và/hoặc ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt được bộc lộ trong phần nêu trên. Việc sàng lọc thế hệ con có thể được thực hiện như phương pháp tiêu chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng PCR hoặc phương pháp thâm tách Nam.

Phương pháp khác sản xuất lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt bao gồm việc cho lợn được biến đổi gen đồng hợp đối với sự bất hoạt *SIGLEC1* giao phối với lợn được biến đổi gen đồng hợp đối với sự bất hoạt *CD163* để tạo ra thế hệ con F1, cho thế hệ con F1 giao phối để tạo ra thế hệ con F2, và sàng lọc thế hệ con F2 để xác định lợn đồng hợp đối với cả hai sự bất hoạt *SIGLEC1* và *CD163*.

Phương pháp khác nữa để sản xuất lợn được biến đổi gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt bao gồm việc cho lợn được biến đổi gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt giao phối với lợn khác được cải biến gen, trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt để tạo ra thế hệ con F1; và sàng lọc thế hệ con F1 để xác định lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt.

Sáng chế còn đề xuất thế hệ con của lợn được cải biến gen được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên, trong đó một hoặc cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và/hoặc trong đó một hoặc cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt gen *CD163* khiến cho protein

CD163 không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Ngoài việc có thể thu được nhờ cách nhân giống liên quan đến động vật dị hợp, động vật đột biến đồng hợp cũng có thể được thu được bằng cách sử dụng cách trong đó tế bào (ví dụ, nguyên bào sợi thai) bao gồm đột biến ở một alen, như tế bào thu được từ động vật được tạo ra bằng cách áp dụng phương pháp nêu trên, được đưa vào gen hướng đích bằng cách tái tổ hợp tương đồng để cải biến alen còn lại. Sau đó, tế bào cho thu được có thể được sử dụng làm nguồn nhân cải biến để chuyển nhân vào tế bào nhận, như noãn bào đã được rút nhân, để tạo ra phôi đột biến đồng hợp, mà khi được cấy vào động vật cái thay thế, sẽ phát triển thành động vật đột biến đồng hợp. Lợn được cải biến gen, trong đó cả hai alen của gen *SIGLEC1* và/hoặc *CD163* bị làm bất hoạt cũng có thể được tạo ra bằng cách tiêm hoặc tải nạp nucleaza lỗi kẽm hoặc Tal nucleaza (có thể hướng đích cả hai alen của gen tại cùng một thời điểm) vào dưỡng bào, tiếp theo chuyển nhân dưỡng bào (somatic cell nuclear transfer -CNT) và chuyển phôi vào lợn thay thế để tạo ra lợn. Sáng chế còn đề xuất thế hệ con của lợn được cải biến gen này, trong đó một hoặc cả hai alen của gen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt và/hoặc trong đó một hoặc cả hai alen của gen *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt gen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV).

Bằng cách mô tả sáng chế một cách chi tiết, rõ ràng rằng các cải biến và biến dị có thể có được sẽ không nằm ngoài phạm vi của sáng chế được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế được đưa ra để làm rõ hơn sáng chế.

Ví dụ 1

Cải biến gen *SIGLEC1*

Cách dùng để phân cắt gen sialoadhesin bao gồm việc sử dụng phép tái tổ hợp tương đồng để loại bỏ exon mã hóa protein và đưa các mã chặn chưa hoàn chỉnh vào trình tự ghi mã còn lại của gen sialoadhesin. Gen sialoadhesin của lợn (*SIGLEC1*, trình tự tham chiếu NCBI là NM_214346) mã hóa protein 210-kDa từ bản sao ARN

thông tin có 5193 bazơ (Vanderheijden et al., 2003). Trình tự hệ gen của lợn từ vùng xung quanh gen sialoadhesin (số truy cập ngân hàng gen là CU467609) được sử dụng để tạo ra oligonucleotit khuếch đại các đoạn hệ gen bằng PCR có độ tin cậy cao [AccuTaq (do Invitrogen cung cấp)] để tạo ra sản phẩm thiết kế hướng đích. Một mảnh (“nhánh trên”) chứa exon mã hóa thứ nhất và 3304 cặp bazơ nằm trước điểm bắt đầu dịch mã. Mảnh thứ hai (nhánh dưới) có chiều dài 4753 cặp bazơ và chứa hầu hết intron nằm sau exon mã hóa thứ ba và kéo dài đến intron thứ 6 (kể cả các exon mã hóa thứ 4, 5 và 6). Trên cơ sở so sánh với trình tự hệ gen sialoadhesin của chuột nhắt và người, gen sialoadhesin của lợn được dự đoán là được cấu thành bởi 21 exon (Hình 1A, 1B). Exon 2 được bảo toàn giữa lợn, chuột nhắt, và người. Việc sắp xếp thành hàng các axit amin của exon 2 cho thấy rằng sáu axit amin trong sialoadhesin của chuột nhắt vốn đã được biết là liên quan đến hoạt tính gắn kết axit sialic được bảo toàn ở sialoadhesin lợn (Hình 1C). Chiến lược hướng đích ban đầu tập trung vào việc tạo ra sự biến đổi trong gen sialoadhesion sao cho không thu được protein chức năng từ gen đột biến. Các chiến lược làm bất hoạt khác có thể bao gồm việc cải biến hướng đích các gốc được chọn trong exon 2 của gen sialoadhesin hoặc thay đổi miền globulin miễn dịch theo cách dự đoán trước để ngăn ngừa sự gắn kết virus PRRS (có thể được thực hiện bằng cách làm thay đổi trật tự của chúng hoặc bằng cách thay thế chúng cho các miền có thể so sánh được từ các loài khác). Các cải biến khác có thể bao gồm việc đặt các điểm loxP vào bên sườn catxet neomycin hoặc một trong số miền tương tự globulin miễn dịch để cho phép gây cảm ứng hoặc loại bỏ đặc hiệu mô, nếu muốn.

Trong việc phân cắt gen hiện có, một phần exon 1 và toàn bộ các exon 2 và 3 được thay thế bằng catxet chọn lọc neomycin bằng cách sử dụng vector kiểu thay thế (Hình 1D) (Mansour et al., 1988). Trong cấu trúc plasmit, đoạn khởi đầu phosphoglyxerol kinaza (PGK) được sử dụng để định hướng sự biểu hiện của catxet neomycin nhằm cho phép chọn lọc dương tính các khuẩn lạc được chuyển nhiễm.

Chuẩn bị tế bào cho

Dòng tế bào nguyên thủy nguyên bào sợi của thai đực, từ ngày 35 trong giai đoạn mang thai, được phân lập từ lợn trắng được nuôi ở quy mô thương mại lớn (Landrace). Các tế bào này được nuôi cấy và cho sinh trưởng trong 48 giờ để có mức độ nhập dòng 80% trong môi trường Eagles được cải biến của Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagles Medium-DMEM) chứa 5mM glutamin, natri bicarbonat (3,7g/l), penixilin-

streptomycin và d-glucoza 1g/l, và có bổ sung 15% huyết thanh bào thai bò Hyclones, gentamycin 10µg/ml, và yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi cơ bản 2,5ng/ml (do Sigma cung cấp). Môi trường được loại bỏ và thay thế bằng môi trường mới vào thời điểm bốn giờ trước khi chuyển nhiễm. Các tế bào nguyên bào sợi được rửa bằng 10ml nước muối đệm phosphat (DPBS; Invitrogen) và rút ra khỏi bình phản ứng dung tích 75cm² bằng 1ml trypsin-EDTA 0,05% (do Invitrogen cung cấp). Các tế bào được tái tạo huyền phù trong DMEM và thu gom bằng cách ly tâm ở 600×g (6000m/s²) trong 10 phút. Các tế bào này được rửa bằng Opti-MEM (do Invitrogen cung cấp) và được ly tâm lại ở 600×g trong 10 phút. Cytosalt (cytosalt 75% [KCl 120mM, CaCl₂ 0,15mM, K₂HPO₄ 10mM; pH 7,6, MgCl₂ 5mM]) và Opti-Mem 25% được sử dụng để tái tạo huyền phù viên lắng (van den Hoff et al., 1992). Các tế bào này được đếm bằng thiết bị đếm tế bào máu và được điều chỉnh đến nồng độ 1×10^6 tế bào trong 1ml. Thực hiện kỹ thuật đục lỗ bằng xung điện đối với các tế bào bằng 4µg ADN hướng đích sợi đơn (thu được bằng cách làm biến tính do nhiệt) trong 200µl môi trường chuyển nhiễm chứa 1×10^6 tế bào/ml. Các tế bào này được xung điện trong thiết bị thao tác tế bào dùng điện BTX ECM 2001 bằng cách sử dụng ba xung điện 250V trong 1 mili giây. Các tế bào đã được xung điện được pha loãng trong DMEM/FBS/FGF đến mức độ 10000 các tế bào trên đĩa 13cm. Các tế bào đã được điện chuyển này được nuôi cấy qua đêm mà không cần áp suất chọn lọc. Ngày tiếp theo, môi trường này được thay thế bằng môi trường nuôi cấy chứa G418 (0,6mg/ml). Sau 10 ngày chọn lọc, các khuẩn lạc kháng G418 được phân lập và chuyển đến các đĩa 24 lỗ để nhân lên. Sau khi sinh trưởng trên các đĩa có 24 lỗ, các tế bào được chia (~một nửa được dùng để phân lập ADN hệ gen) vào các đĩa có 6 lỗ. PCR được áp dụng để xác định xem việc hướng đích gen sialoadhesin có thành công hay không. Phản ứng này sử dụng oligonucleotit vốn được ghép vào catxet phosphoglucokinaza (PGK) (chứa Neo) kết cặp với oligonucleotit vốn được ghép vào ADN hệ gen trong locus sialoadhesin mà locus sialoadhesin nằm ngoài vùng các nhánh hướng đích (xem Hình 2). Việc hướng đích thành công cả hai ‘nhánh’ được đánh giá theo cách này. Dòng nguyên bào sợi hướng đích (4-18) được xác định và một số tế bào trong môi trường nuôi cấy này được sử dụng cho quá trình chuyển nhân (xem dưới đây) trong khi các tế bào khác được làm đông lạnh để sử dụng sau. Việc xác nhận sự tái tổ hợp tương đồng bằng cách thẩm tách Southern được sử dụng để khẳng định thêm sự hướng đích thành công.

Thu gom noãn bào và thành thực *in vitro* (*in vitro* Maturation - IVM)

Noãn bào lợn được mua từ ART Inc (Madison, WI) và được làm thành thực theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Sau thời gian 42 giờ đến 44 giờ làm thành thực *in vitro*, noãn bào được tách khỏi các tế bào kết cụm với chúng bằng cách khuấy nhẹ trong dung dịch chứa hyaluronidaza 0,5mg/ml. Sau khi loại bỏ các tế bào kết cụm, noãn bào có hình thái học tốt và thể cực nhìn thấy được (pha giữa II) được chọn lọc và bảo quản trong môi trường vi thao tác ở 38,5°C đến khi chuyển nhân.

Chuyển nhân dưỡng bào, dung hợp/hoạt hóa noãn bào phức chuyển nhân, và nuôi cấy phát triển *in vitro*

Dưới kính hiển vi, noãn bào không kết cụm được giữ ở dạng giọt bằng micropipet giữ trong môi trường vi thao tác có bổ sung xytochalsin B 7,5µg/ml và phủ bằng dầu khoáng. Xuyên micropipet tiêm bằng thủy tinh mịn qua vùng sáng gần thể cực thứ nhất, và hút thể cực thứ nhất và bào chất liền kề, được giả định là chứa nhiễm sắc thể pha giữa II, vào pipet, rút pipet này ra và loại bỏ các chất bên trong. Chọn tế bào cho đơn, tròn và sáng với bề mặt nhẵn và chuyển vào vùng quanh noãn hoàng liền kề màng noãn bào (Lai et al., 2006; Lai et al., 2002).

Phức chuyển nhân (noãn bào + nguyên bào sợi) được dung hợp trong môi trường dung hợp với nồng độ canxi thấp (0,3M manitol, 0,1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và 0,5mM HEPES). Sau đó, noãn bào dung hợp được hoạt hóa bằng cách xử lý bằng 200µM thimerosal trong 10 phút trong bóng tối, tiếp theo rửa và xử lý bằng 8mM dithiothreitol (DTT) trong 30 phút; sau đó, noãn bào được rửa lại để loại bỏ DTT (Macháty và Prather 2001; Machaty et al., 1997). Sau khi dung hợp/hoạt hóa, noãn bào được rửa ba lần bằng môi trường hợp tử lợn 3 (PZM3) có bổ sung BSA 4mg/ml (Im et al., 2004), và được nuôi cấy ở 38,5°C trong khí quyển đã được tạo ẩm chứa 5% O_2 , 90% N_2 và 5% CO_2 trong thời gian 30 phút. Các phức đã được dung hợp thành công được nuôi cấy trong thời gian 15 giờ đến 21 giờ đến khi chuyển phôi bằng cách phẫu thuật sang lợn thay thế.

Chuẩn bị lợn thay thế, chuyển phôi, chẩn đoán mang thai và sinh nở

Lợn nái con thay thế được đồng bộ hóa bằng cách trộn 18mg đến 20mg REGU-MATE (dung dịch altrenogest 0,22%) (do Intervet, Millsboro, DE cung cấp) vào thức ăn trong 14 ngày bằng cách sử dụng sơ đồ tùy thuộc vào giai đoạn của chu kỳ động

dục. Sau khi xử lý bằng REGU-MATE lần cuối (105 giờ), tiêm tĩnh mạch 1000 đơn vị hCG để gây động dục. Các con lợn thay thế khác có chu kỳ tự nhiên vào ngày thích hợp cũng nằm trong nhóm lợn thay thế. Sử dụng các con lợn thay thế vào ngày chịu dục (ngày 0), hoặc ngày thứ nhất tiếp theo (Lai et al., 2002). Các con lợn thay thế được chuẩn bị vô khuẩn và bị rạch ở phần bụng để bộc lộ đường sinh sản. Phôi được chuyển vào một ống dẫn trứng thông qua tua buồng trứng. Các con lợn thay thế được khám thai bằng cách siêu âm vùng bụng vào khoảng ngày 30, và sau đó khám mỗi tuần một lần trong suốt quá trình mang thai. Lợn thường sinh vào thời điểm 114 ngày mang thai.

Sau khi chuyển nhiễm và sàng lọc tế bào cho ứng viên, các tế bào nguyên bào sợi thai được xác định và được sử dụng để chuyển nhân dưỡng bào (somatic cell nuclear transfer-SCNT). Sáu trăm và sau mười sáu phôi SCNT được chuyển sang hai con lợn thay thế. Một con sinh 6 con lợn con dục bình thường vào ngày mang thai thứ 115, và thủ thuật Xeda được thực hiện trên con lợn thay thế khác vào ngày mang thai thứ 117 để lấy ra hai con lợn con dục bình thường, như nêu trong Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả chuyển phôi sau khi sử dụng tế bào cho của con lợn dục *SIGLEC1* +/-

Ngày	Con lợn thay thế	Kiểu gen	# lần chuyển	Kết quả
23/9/2010	O963	<i>SIGLEC1</i> ^{+/-} ♂	388	6 con lợn con dục bình thường được sinh ra vào ngày 16/1/2011
24/9/2010	O962	<i>SIGLEC1</i> ^{+/-} ♂	278	2 con lợn con dục bình thường được lấy ra bằng thủ thuật Xeda vào ngày 18/1/2011

Hình 2 thể hiện tổ chức của gen sialoadhesin (*SIGLEC1*), vector hướng đích và kiểu gen tái tổ hợp dự đoán. Khối trên của Hình 2 thể hiện sản phẩm thiết kế hướng đích được sử dụng cho việc tái tổ hợp tương đồng. Như nêu trên, mảnh ADN ‘trên’ được sử dụng để tạo ra sản phẩm thiết kế hướng đích chiếm ~3,5kb nằm trước exon 1 và chứa một phần exon 1 (sau mã khởi đầu). Mảnh ADN ‘dưới’ bắt đầu bên trong intron 3 và chứa exon 4, 5, 6 và một phần exon 7. Hầu hết exon 1 và các exon 2 và 3 được thay thế bằng catxet neomycin (neo); catxet thymidin kinaza (TK) nằm ngay sau nhánh dưới để làm thành phần đánh dấu chọn lọc âm tính, nếu cần. Khối dưới của

Hình 2 minh họa gen sialoadhesin đột biến sau khi tái tổ hợp tương đồng. Các mũi tên biểu thị vị trí liên kết oligonucleotit dùng để sàng lọc các dòng tế bào hướng đích và lặn tách dòng trên cơ sở PCR. Việc hướng đích bởi các nhánh trên và dưới được thực hiện bằng cách ghép oligonucleotit như được thể hiện bằng các mũi tên lần lượt thể hiện các đoạn mỗi “hướng đích sialo trên C” và “PGK polyA ngược” (SEQ ID NO: 1 và 3) và “thuận biến đoạn khởi đầu PGK” và “7Rw1” (SEQ ID NO: 4 và 6). Các trình tự oligonucleotit được liệt kê trong Bảng 2 dưới đây. Việc kiểm tra thêm bằng PCR sử dụng oligonucleotit nằm bên sườn vùng/Neo catxet bị cắt bỏ (đoạn mỗi “Exon 1 đầu tận cùng ck” và “đảo ngược Intron 3 ck” (lần lượt là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2 và 5)). Có mức chênh lệch khoảng 500 cặp bazơ về kích thước sản phẩm giữa alen bị ngắt quãng và alen kiểu dại.

Bảng 2. Tên đoạn mỗi và trình tự dùng trong dự án này

sialo trên hướng đích C	ggaacaggctgagccaataa (SEQ ID NO: 1)
Exon 1 đầu tận cùng ck	gcattcctaggcacagc (SEQ ID NO: 2)
PGK polyA ngược	gggttctaagtactgtggtttcc (SEQ ID NO: 3)
PGK khởi đầu thuận	agaggccacttgtgtagcgc (SEQ ID NO: 4)
Intron 3 ck ngược	ctccttgccatgtccag (SEQ ID NO: 5)
7Rw1	cagggtaccaggaaaaacgggt (SEQ ID NO: 6)

Các đoạn mỗi nêu trong Bảng 2 được gán số trình tự ID trên cơ sở vị trí của mũi tên trong khối dưới của Hình 2 tính từ trái sang phải. Do đó, mũi tên ngoài cùng bên trái trong khối dưới của Hình 2 thể hiện vị trí của đoạn mỗi “sialo trên hướng đích C” (SEQ ID NO: 1), mũi tên tiếp theo về bên phải thể hiện vị trí của đoạn mỗi “Exon 1 đầu tận cùng ck” (SEQ ID NO: 2), mũi tên tiếp theo về bên phải thể hiện vị trí của đoạn mỗi “PGK polyA ngược” (SEQ ID NO: 3), và trình tự tương tự.

Sàng lọc để làm bất hoạt *SIGLEC1*

ADN hệ gen được phân lập từ lợn con và được sử dụng để xác nhận sự kiện hướng đích. Việc hướng đích gen *SIGLEC1* thành công được xác định bằng cách sử dụng PCR với oligonucleotit vốn được ghép bên trong catxet Neo kết cặp với oligonucleotit vốn được ghép vào ADN hệ gen *SIGLEC1* nằm ngoài vùng chứa trong sản phẩm thiết kế hướng đích. Trong khối phía trên của Hình 3, việc hướng đích bởi

nhánh ‘trên’ được xác minh bằng cách sử dụng oligonucleotit ‘PGK polyA ngược’ và ‘sialo trên hướng đích C’ (lần lượt là SEQ ID NO. 3 và SEQ ID NO.1; được minh họa trên Hình 2). Thu được sản phẩm có kích thước mong muốn (~4500bp). Trong khối dưới, việc hướng đích thành công bởi nhánh ‘dưới’ được xác định bằng cách sử dụng oligonucleotit thuận biến đoạn khởi đầu PGK và “7Rw1” (lần lượt là SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6; được minh họa trên Hình 2). Thu được sản phẩm có kích thước mong muốn (~5000bp). Đối chứng ‘plasmit nhánh dưới’ là cấu trúc không hoàn chỉnh chứa catxet Neo với mảnh gen sialoadhesin chứa hầu hết intron 3 và hầu hết exon 7. Oligonucleotit 7Rw1 có thể ghép với trình tự exon 7 có mặt trong plasmit, và cùng với oligonucleotit thuận biến đoạn khởi đầu PGK, có thể tạo ra sản phẩm tương đồng với sản phẩm được tạo ra từ sự kiện hướng đích thành công. Cả hai khối đều minh họa các phản ứng PCR hướng đích được thực hiện trên ADN hệ gen phân lập được từ tám dòng lợn con được tạo ra từ dòng nguyên bào sợi thai hướng đích 4-18.

Việc phát hiện cả alen sialoadhesin kiểu dại và đã hướng đích được thực hiện bằng cách sử dụng PCR với oligonucleotits vốn được ghép với ADN nằm bên sườn vùng hướng đích của gen sialoadhesin. Oligonucleotit ‘Exon 1 đầu tận cùng ck’ và ‘Intron 3 ck ngược’ được sử dụng (lần lượt là SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 5; được minh họa trên Hình 2). Các sản phẩm được tạo ra có độ dài ~2400 cặp bazơ đối với alen kiểu dại và ~2900 cặp bazơ đối với alen hướng đích. Trên Hình 4, khối trái (Hình 4A) minh họa các phản ứng thử nghiệm được thực hiện trên ADN hệ gen kiểu dại, plasmit hướng đích được sử dụng để chuyển nhiễm, ADN hệ gen (4-18) thu được từ dòng nguyên bào sợi hướng đích thành công (lưu ý hai dải) và ADN hệ gen (4-3) thu được từ dòng nguyên bào sợi không hướng đích. Khối phải (Hình 4B) minh họa phản ứng được thực hiện trên ADN hệ gen phân lập được từ tám dòng lợn con các được tạo ra từ dòng nguyên bào sợi thai hướng đích 4-18. Có hai sản phẩm PCR có kích thước mong muốn trên mỗi làn, trong khi các khuôn ADN kiểu dại và plasmit hướng đích chỉ có một dải đơn. Do đó, tất cả các con lợn con được tạo ra bởi SCNT là dị hợp đối với đột biến đã định, tức là SIGLEC+/-.

Tạo ra lợn đồng hợp

Lợn đực được cải biến gen, mà được xác định là dị hợp đối với sự bất hoạt *SIGLEC1*, được sử dụng làm lợn sáng lập đực (thế hệ F0), và được cho giao phối với lợn cái kiểu dại để tạo ra lợn đực và lợn cái có một alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt (F1).

Sau đó, lợn đực F1 được cho giao phối với lợn cái F1 để tạo ra thế hệ con F2, có cả hai alen *SIGLEC1* bị làm bất hoạt. Các con lợn này có thể được xác định sau khi sinh bằng phép PCR nêu trên đối với *SIGLEC1* hoặc theo cách khác, bằng phương pháp thẩm tách Nam.

Ví dụ 2

Tạo ra sản phẩm thiết kế hướng đích *CD163*

Như nêu trên, việc loại bỏ miền tế bào chất của *CD163* sẽ loại trừ sự lây nhiễm PRRSV, cũng như loại bỏ hoặc cải biến miền 5 SRCR. Vì một số trong số các miền SRCR của *CD163* có chức năng quan trọng đối với sự sống sót của động vật, ví dụ, loại bỏ hemoglobin, biến đổi gen sao cho các chức năng khác vẫn còn nguyên vẹn là chiến lược vững chắc để tạo ra lợn kháng PRRSV. Nghiên cứu trước đây cũng đã ám chỉ rằng việc thay thế miền SRCR5 bằng miền *CD163L* 8 cũng sẽ chặn đứng sự lây nhiễm (Van Gorp et al., 2010b). Do đó, sản phẩm thiết kế hướng đích có thể được thiết kế như được thể hiện trên Hình 6 để đổi SRCR5 của *CD163* bằng miền SRCR *CD163L*.

Một khi sản phẩm thiết kế hướng đích đã được tạo ra, thì có thể tạo ra lợn được biến đổi gen dị hợp đối với *CD163* bị làm bất hoạt, trong đó việc làm bất hoạt gen *CD163* khiến cho protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) theo các phương pháp nhìn chung là giống các phương pháp được bộc lộ trong Ví dụ 1. Trước hết, vector hướng đích được chèn vào tế bào cho, ở chỗ mà nó có thể tái tổ hợp với gen nội sinh *CD163e*. Sau đó, tế bào cho có cải biến đặc hiệu này được chọn lọc và sử dụng để chuyển nhân dưỡng bào nhằm tạo ra phôi được cải biến gen. Sau đó, phôi được chuyển sang lợn thay thế để mang thai. Sau khi xác định lợn chuyển gen có alen *CD163* bị làm bất hoạt bằng hoặc PCR hoặc phương pháp thẩm tách Nam, các con lợn này được để cho trưởng thành về mặt sinh dục, và sau đó được để cho giao phối tự nhiên để chuyển gen sang thai hoặc con lợn cái.

Tài liệu tham khảo

Albina E, Madec F, Cariolet R, Torrison J. 1994. Immune Response and Persistence of the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Infected Pigs and Farm Units. *Veterinary Record* 134(22):567-573.

Allende R, Laegreid WW, Kutish GF, Galeota JA, Wills RW, Osorio FA. 2000. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *Journal of Virology* 74(22):10834-10837.

Andreyev VG, Wesley RD, Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM. 1997. Genetic Variation and Phylogenetic Relationships of 22 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Field Strains Based on Sequence Analysis of Open Reading Frame 5. *Archives of Virology* 142(5):993-1001.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE, Harris L, Goyal SM, Robison D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D. 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4:127-133.

Benfield DA, Nelson J, Rossow KD, Rowland RR, Lawson SR, Steffen M, Collins M. 1998. Pathogenesis and persistence of PRRS. *Proceedings, Allen D. Leman Swine Conference*:169-171.

Christopherhennings J, Nelson EA, Hines RJ, Nelson JK, Swenson SL, Zimmerman JJ, Chase CCL, Yaeger MJ, Benfield DA. 1995. Persistence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Serum and Semen of Adult Boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7(4):456-464.

Christopherhennings J, Nelson EA, Nelson JK, Benfield DA. 1997. Effects of a Modified-Live Virus Vaccine against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Boars. *American Journal of Veterinary Research* 58(1):40-45.

Crocker PR, Gordon S. 1986. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages. *J Exp Med* 164(6):1862-1875.

Crocker PR, Vinson M, Kelm S, Drickamer K. 1999. Molecular analysis of sialoside binding to sialoadhesin by NMR and site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal* 341(Part 2):355-361.

Das PB, Dinh PX, Ansari IH, de Lima M, Osorio FA, Pattnaik AK. 2010. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor *CD163*. *J Virol* 84(4):1731-1740.

Dee SA, Molitor TW. 1998. Elimination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Using a Test and Removal Process. *Veterinary Record* 143(17):474-476.

Delputte PL, Meerts P, Costers S, Nauwynck HJ. 2004. Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 102(3):179-188.

Delputte PL, Nauwynck HJ. 2004. Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *Journal of Virology* 78(15):8094-8101.

Delputte PL, Van Breedam W, Delrue I, Oetke C, Crocker PR, Nauwynck HJ. 2007. Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J Virol* 81(17):9546-9550.

Im G-S, Lai L, Liu Z, Hao Y, Prather RS. 2004. *in vitro* development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres. *Theriogenology* 61:1125-1135.

Keffaber KK. 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 1:1-9.

Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409(6817):198-201.

Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. 1999. Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *American Journal of Veterinary Research* 60(8):1022-1027.

Lai L, Kang JX, Li R, Wang J, Witt W, Yong HY, Hao Y, Wax D, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans R, Starzl TE, Prather RS, Dai Y. 2006. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology* 24:435-437.

Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295(5557):1089-1092.

Macháty Z, Prather RS. 2001. Complete activation of mammalian oocytes. US Patent Issued April 17: #6,211,429.

Machaty Z, Wang WH, Day BN, Prather RS. 1997. Complete Activation of Porcine Oocytes Induced by the Sulfhydryl Reagent, Thimerosal. *Biology of Reproduction* 57(5):1123-1127.

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352.

Meng XJ. 2000. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development [Review]. *Veterinary Microbiology* 74(4):309-329.

Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, Morozov I. 1995. Sequence Comparison of Open Reading Frames 2 to 5 of Low and High Virulence United States Isolates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of General Virology* 76(Part 12):3181-3188.

Mengeling WL, Vorwald AC, Lager KM, Clouser DF, Wesley RD. 1999. Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *American Journal of Veterinary Research* 60(3):334-340.

Molitor TW, Bautista EM, Choi CS. 1997. Immunity to Prrsv - Double-Edged Sword. *Veterinary Microbiology* 55(1-4):265-276.

Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. 1995. Comparison of the Structural Protein Coding Sequences of the Vr-2332 and Lelystad Virus Strains of the Prrs Virus. *Archives of Virology* 140(8):1451-1460.

Nath D, van der Merwe PA, Kelm S, Bradfield P, Crocker PR. 1995. The amino-terminal immunoglobulin-like domain of sialoadhesin contains the sialic acid binding site. Comparison with CD22. *J Biol Chem* 270(44):26184-26191.

Nauwynck HJ, Duan X, Favoreel HW, Van Oostveldt P, Pensaert MB. 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *Journal of General Virology* 80(Part 2):297-305.

Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents. *Journal of Virology* 73(1):270-280.

Nielsen HS, Liu G, Nielsen J, Oleksiewicz MB, Botner A, Storgaard T, Faaberg KS. 2003. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virology* 77(6):3702-3711.

Nielsen MJ, Madsen M, Moller HJ, Moestrup SK. 2006. The macrophage scavenger receptor *CD163*: endocytic properties of cytoplasmic tail variants. *J Leukoc Biol* 79(4):837-845.

Oetke C, Vinson MC, Jones C, Crocker PR. 2006. Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels. *Mol Cell Biol* 26(4):1549-1557.

Plagemann PGW. 1996. Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses. In *Fields Virology*, 3rd Ed, Fields, B et al, ed:1105-1120.

Ritter M, Buechler C, Langmann T, Orso E, Klucken J, Schmitz G. 1999a. The scavenger receptor *CD163*: regulation, promoter structure and genomic organization. *Pathobiology* 67(5-6):257-261.

Ritter M, Buechler C, Langmann T, Schmitz G. 1999b. Genomic organization and chromosomal localization of the human *CD163* (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 260(2):466-474.

Ropp SL, Wees CEM, Fang Y, Nelson EA, Rossow KD, Bien M, Arndt B, Preszler S, Steen P, Christopher-Hennings J, Collins JE, Benfield DA, Faaberg KS. 2004. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *Journal of Virology* 78(7):3684-3703.

Rowland RR, Steffen M, Ackerman T, Benfield DA. 1999. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 259:262-266.

Sanchez-Torres C, Gomez-Puertas P, Gomez-del-Moral M, Alonso F, Escribano JM, Ezquerro A, Dominguez J. 2003. Expression of porcine *CD163* on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol* 148(12):2307-2323.

Snijder EJ, Meulenberg JJM. 1998. THE MOLECULAR BIOLOGY OF ARTERIVIRUSES [Review]. *Journal of General Virology* 79(Part 5):961-979.

Suarez P, Diazguerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A, Ortin J. 1996. Open Reading Frame 5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus as a Cause of Virus-Induced Apoptosis. *Journal of Virology* 70(5):2876-2882.

Sur JH, Cooper VL, Galeota JA, Hesse RA, Doster AR, Osorio FA. 1996. *in vivo* Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Rna by in Situ Hybridization at Different Times Postinfection. *Journal of Clinical Microbiology* 34(9):2280-2286.

Sur JH, Doster AR, Christian JS, Galeota JA, Wills RW, Zimmerman JJ, Osorio FA. 1997. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replicates in Testicular Germ Cells, Alters Spermatogenesis, and Induces Germ Cell Death by Apoptosis. *Journal of Virology* 71(12):9170-9179.

Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, Misinzo G, Vanderheijden N, Duan X, Nauwynck HJ. 2010a. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol* 91(Pt 7):1659-1667.

Van Breedam W, Van Gorp H, Zhang JQ, Crocker PR, Delputte PL, Nauwynck HJ. 2010b. The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and

respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. PLoS Pathog 6(1):e1000730.

van den Hoff MJ, Moorman AF, Lamers WH. 1992. Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. Nucleic Acids Res 20(11):2902.

Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. 2010a. Scavenger receptor *CD163*, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. Mol Immunol 47(7-8):1650-1660.

Van Gorp H, Van Breedam W, Delputte PL, Nauwynck HJ. 2008. Sialoadhesin and *CD163* join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Gen Virol 89(Pt 12):2943-2953.

Van Gorp H, Van Breedam W, Van Doorselaere J, Delputte PL, Nauwynck HJ. 2010b. Identification of the *CD163* protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. J Virol 84(6):3101-3105.

Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, Vandekerckhove J, Van Damme J, van Woensel PA, Nauwynck HJ. 2003. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. Journal of Virology 77(15):8207-8215.

Vinson M, Vandermerwe PA, Kelm S, May A, Jones EY, Crocker PR. 1996. Characterization of the Sialic Acid-Binding Site in Sialoadhesin by Site-Directed Mutagenesis. Journal of Biological Chemistry 271(16):9267-9272.

Welch SKW, Calvert JG. 2010. A brief review of *CD163* and its role in PRRSV infection. Virus Research 154:98-103.

Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemrad M, de Kluyter EP, Kragten C, van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van't Veld P, Groenland GJR, van Gennep JA, Voets MTH, Verheijden JHM, Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Veterinary Quarterly 13:121-130.

Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopherhennings J, Nelson EA. 1997. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus - a Persistent Infection. *Veterinary Microbiology* 55(1-4):231-240.

Wissink EHJ, van Wijk HAR, Pol JMA, Godeke GJ, van Rijn PA, Rottier PJM, Meulenberg JJM. 2003. Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Archives of Virology* 148(1):177-187.

Yoon IL, Joo HS, Christianson WE, Morrison RB, Dial GD. 1993. Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with PRRS virus. *Swine Health and Production* 1:5-8.

Khi xem xét các nội dung của sáng chế hoặc các phương án được ưu tiên, các mao từ “một”, “này” được dự định để có nghĩa là có một hoặc nhiều thành phần. Các thuật ngữ “chứa”, “bao gồm” và “có” được dự định để chứa trong đó và có nghĩa là có thể có các thành phần khác với các thành phần đã nêu.

Theo quan điểm nêu trên, có thể thấy được rằng đã đạt được một vài mục đích của sáng chế và các kết quả có lợi khác.

Vì có thể có nhiều thay đổi trong các sản phẩm và các phương pháp nêu trên mà không vượt khỏi phạm vi của sáng chế, nên dự tính rằng tất cả các vấn đề nêu trong phần mô tả nêu trên và được thể hiện bằng các hình vẽ kèm theo sẽ được giải thích nhằm mục đích minh họa và không có ý nghĩa đặt ra giới hạn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Lợn biến đổi gen chứa đột biến làm bất hoạt ở alen của gen *CD163*.
2. Lợn biến đổi gen chứa đột biến làm bất hoạt ở alen của gen *SIGLEC1*.
3. Lợn biến đổi gen theo điểm 1 hoặc 2, trong đó lợn này chứa các đột biến làm bất hoạt ở cả hai alen của gen *SIGLEC1*.
4. Lợn biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó lợn này chứa các đột biến làm bất hoạt ở cả hai alen của gen *CD163*.
5. Lợn biến đổi gen chứa đột biến làm bất hoạt ở alen của gen *SIGLEC1* và đột biến làm bất hoạt ở alen của gen *CD163*.
6. Lợn biến đổi gen theo điểm 1, trong đó đột biến làm thay đổi sự biểu hiện hoặc hoạt tính của *CD163*.
7. Lợn biến đổi gen theo điểm 4, trong đó các đột biến này làm thay đổi sự biểu hiện hoặc hoạt tính của *CD163*.
8. Lợn biến đổi gen theo điểm 1, trong đó đột biến này bao gồm chèn thêm, loại bỏ, đột biến dịch khung, đột biến không có nghĩa, đột biến sai nghĩa hoặc đột biến điểm.
9. Lợn biến đổi gen theo điểm 4, trong đó các đột biến này bao gồm chèn thêm, loại bỏ, đột biến dịch khung, đột biến không có nghĩa, đột biến sai nghĩa, đột biến điểm hoặc tổ hợp các đột biến này.
10. Lợn biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đột biến này bao gồm loại bỏ một phần của alen.
11. Lợn biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó đột biến này bao gồm loại bỏ hoàn toàn alen.
12. Lợn biến đổi gen theo điểm 4, trong đó các đột biến này bao gồm loại bỏ một phần các alen, loại bỏ hoàn toàn các alen, hoặc tổ hợp các đột biến này.
13. Lợn biến đổi gen theo điểm 1, trong đó đột biến này bao gồm vô hiệu hoàn toàn alen *CD163*.
14. Lợn biến đổi gen theo điểm 4, trong đó các đột biến này bao gồm vô hiệu hoàn toàn các alen *CD163*.

15. Lợn biến đổi gen theo điểm 1, trong đó đột biến làm bất hoạt này dẫn đến protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV).

16. Lợn biến đổi gen theo điểm 4, trong đó ít nhất một trong số các đột biến làm bất hoạt này dẫn đến protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV).

17. Lợn biến đổi gen theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó alen được làm bất hoạt bằng cách sử dụng hệ tái tổ hợp Cre-lox.

18. Phương pháp tạo ra lợn biến đổi gen trong đó ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* đã được làm bất hoạt, phương pháp này bao gồm các bước:

rút nhân noãn bào lợn;

dung hợp noãn bào với nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *SIGLEC1* đã làm bất hoạt; và

hoạt hóa noãn bào để tạo ra phôi.

19. Phương pháp tạo ra lợn biến đổi gen trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* đã được làm bất hoạt, phương pháp này bao gồm các bước:

rút nhân noãn bào lợn;

dung hợp noãn bào với nguyên bào sợi của lợn cho, hệ gen của nguyên bào sợi này chứa ít nhất một alen *CD163* đã làm bất hoạt; và

hoạt hóa noãn bào để tạo ra phôi.

20. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó:

ít nhất một alen đã được làm bất hoạt bằng cách loại bỏ một phần hoặc loại bỏ hoàn toàn;

ít nhất một alen đã được làm bất hoạt bằng cách sử dụng hệ tái tổ hợp Cre-lox; và/hoặc

alen *SIGLEC1* đã được làm bất hoạt bằng cách loại bỏ một phần exon 1 và tất cả các exon 2 và 3.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18, 19 và 20, trong đó:

bước rút nhân được thực hiện bằng micropipet trong môi trường vi thao tác;

bước dung hợp được thực hiện trong môi trường dung hợp; và/hoặc

bước hoạt hóa noãn bào bao gồm việc ủ noãn bào trong điều kiện có mặt thimerosal.

22. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó ít nhất một alen đã được làm bất hoạt bằng cách loại bỏ một phần.

23. Phương pháp theo điểm 18 hoặc 19, trong đó ít nhất một alen đã được làm bất hoạt bằng cách loại bỏ hoàn toàn.

24. Thế hệ con của lợn biến đổi gen được tạo ra bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 18, 19, 20 và 21, trong đó ở thế hệ con này có:

ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* bị bất hoạt;

ít nhất một alen của gen *CD163* bị bất hoạt;

ít nhất một alen của gen *SIGLEC1* và ít nhất một alen của gen *CD163* bị bất hoạt;

hoặc

cả hai alen của gen *SIGLEC1* và cả hai alen của gen *CD163* đều bị bất hoạt.

25. Thế hệ con của lợn biến đổi gen được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 19, trong đó ít nhất một alen của gen *CD163* bị bất hoạt ở thế hệ con này.

26. Phương pháp tạo ra lợn biến đổi gen theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

thay đổi hàm lượng di truyền của tế bào lợn để tạo ra cải biến mà thay đổi sự biểu hiện hoặc hoạt tính *CD163*; và

tạo ra động vật từ tế bào này.

27. Phương pháp theo điểm 26, trong đó bước thay đổi bao gồm việc sử dụng nucleaza lõi kẽm hoặc nucleaza tác động TAL.

28. Phương pháp theo điểm 26, trong đó bước thay đổi dẫn đến loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn alen *CD163*.

29. Phương pháp theo điểm 26, trong đó bước thay đổi dẫn đến động vật tạo ra protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV).

30. Phương pháp theo điểm 26, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước:

cho con cái được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 26 giao phối với con đực được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 26 để tạo ra thế hệ con F1; và

sàng lọc thế hệ con F1 để nhận dạng các động vật có cải biến ở cả hai alen của gen *CD163*.

31. Phương pháp theo điểm 30, trong đó bước sàng lọc bao gồm việc sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc phương pháp thẩm tách Southern.

32. Phương pháp tạo ra lợn biến đổi gen theo điểm 1, phương pháp này bao gồm bước: đưa nucleaza đặc hiệu vị trí vào tế bào lợn, nucleaza này được làm thích ứng để gắn kết với trình tự đích trong alen của gen *CD163*; và ủ tế bào này trong điều kiện cho phép nucleaza hoạt động trên ADN tại hoặc gần trình tự đích và nhờ đó gây ra tái tổ hợp, sửa chữa theo hướng tương đồng, hoặc kết nối đầu không tương đồng tại hoặc gần vị trí đích.

33. Phương pháp theo điểm 32, trong đó nucleaza đặc hiệu vị trí bao gồm nucleaza lỗi kẽm hoặc nucleaza tác động TAL.

34. Phương pháp theo điểm 32, trong đó bước đưa nucleaza vào tế bào dẫn đến việc loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn alen *CD163*.

35. Phương pháp theo điểm 32, trong đó bước đưa nucleaza vào tế bào dẫn đến tế bào tạo ra protein *CD163* không thể gắn kết và/hoặc phá vỡ virus gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV).

36. Phương pháp theo điểm 32, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tạo ra động vật từ tế bào này.

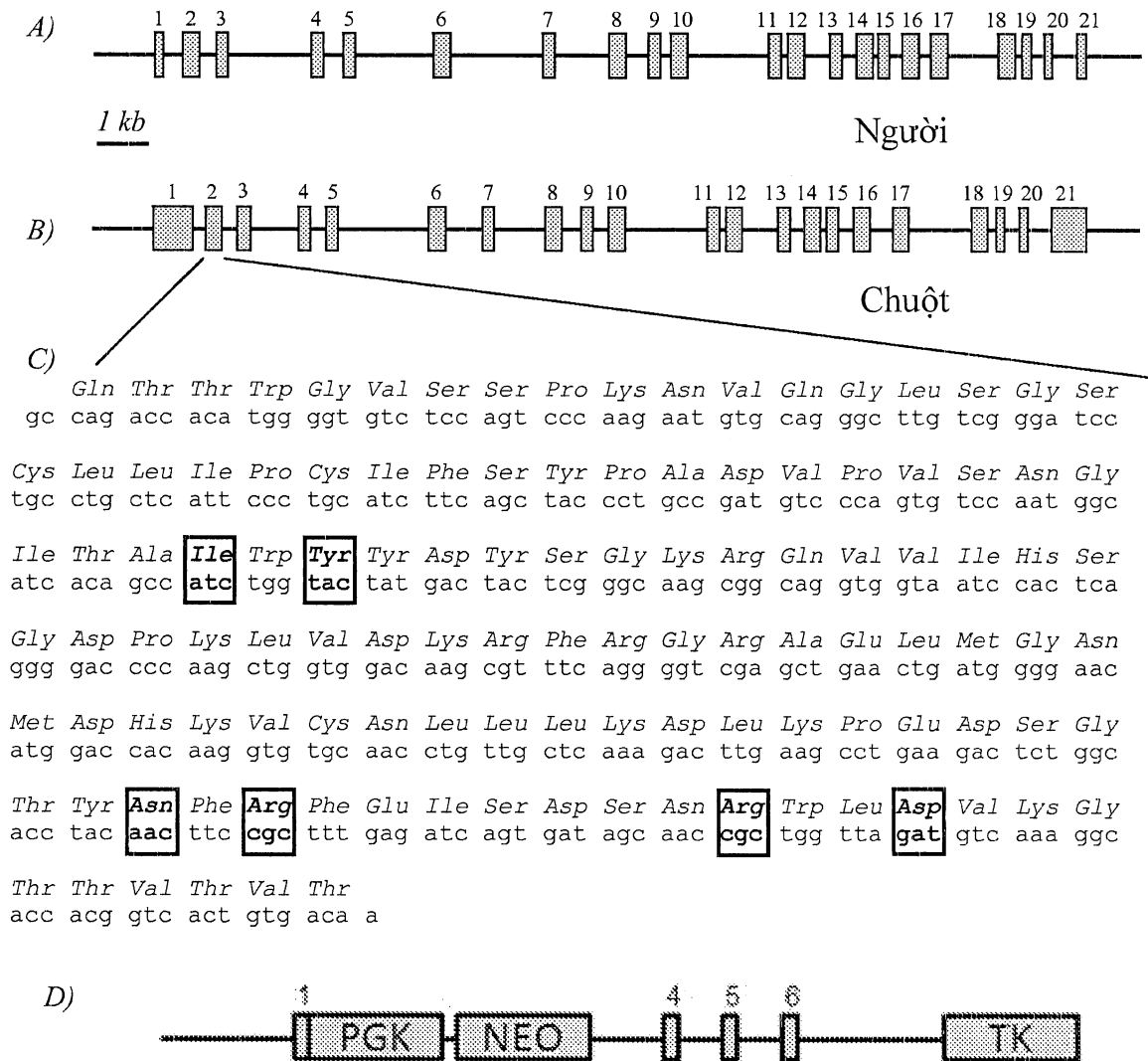
37. Phương pháp theo điểm 36, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho con cái được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 36 giao phối với con đực được tạo ra bằng phương pháp theo điểm 36 để tạo ra thế hệ con F1; và

sàng lọc thế hệ con F1 để nhận dạng các động vật có cải biến ở cả hai alen của gen *CD163*.

38. Phương pháp theo điểm 37, trong đó bước sàng lọc bao gồm việc sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc phương pháp thẩm tách Southern.

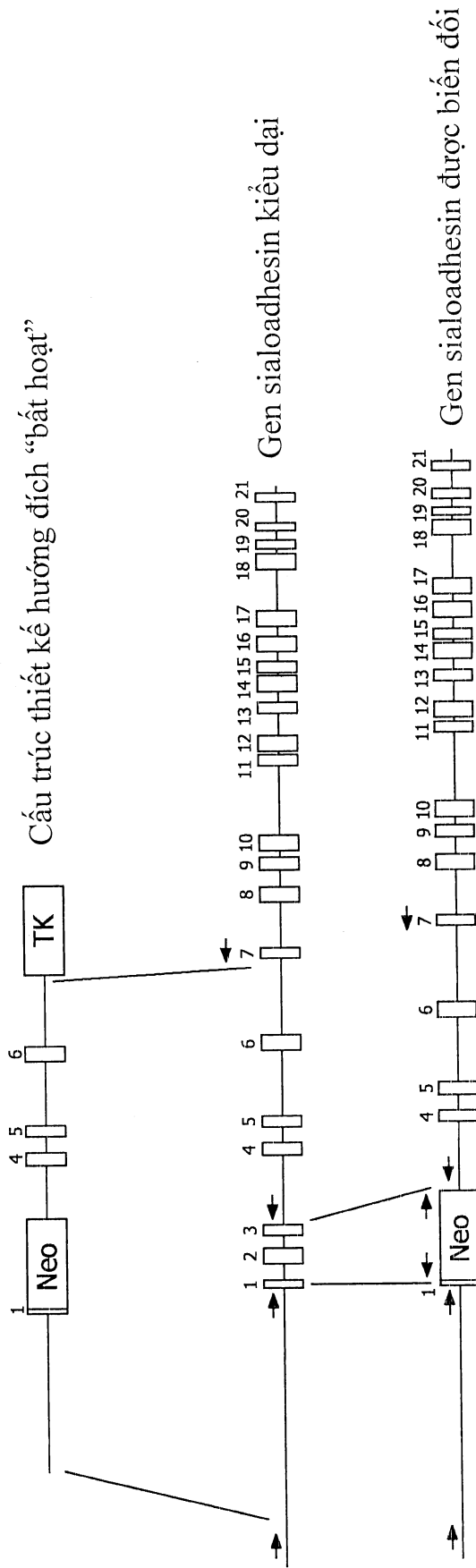
Hình 1

Tổ chức gen sialoadhesin và thiết kế vectơ hướng đích



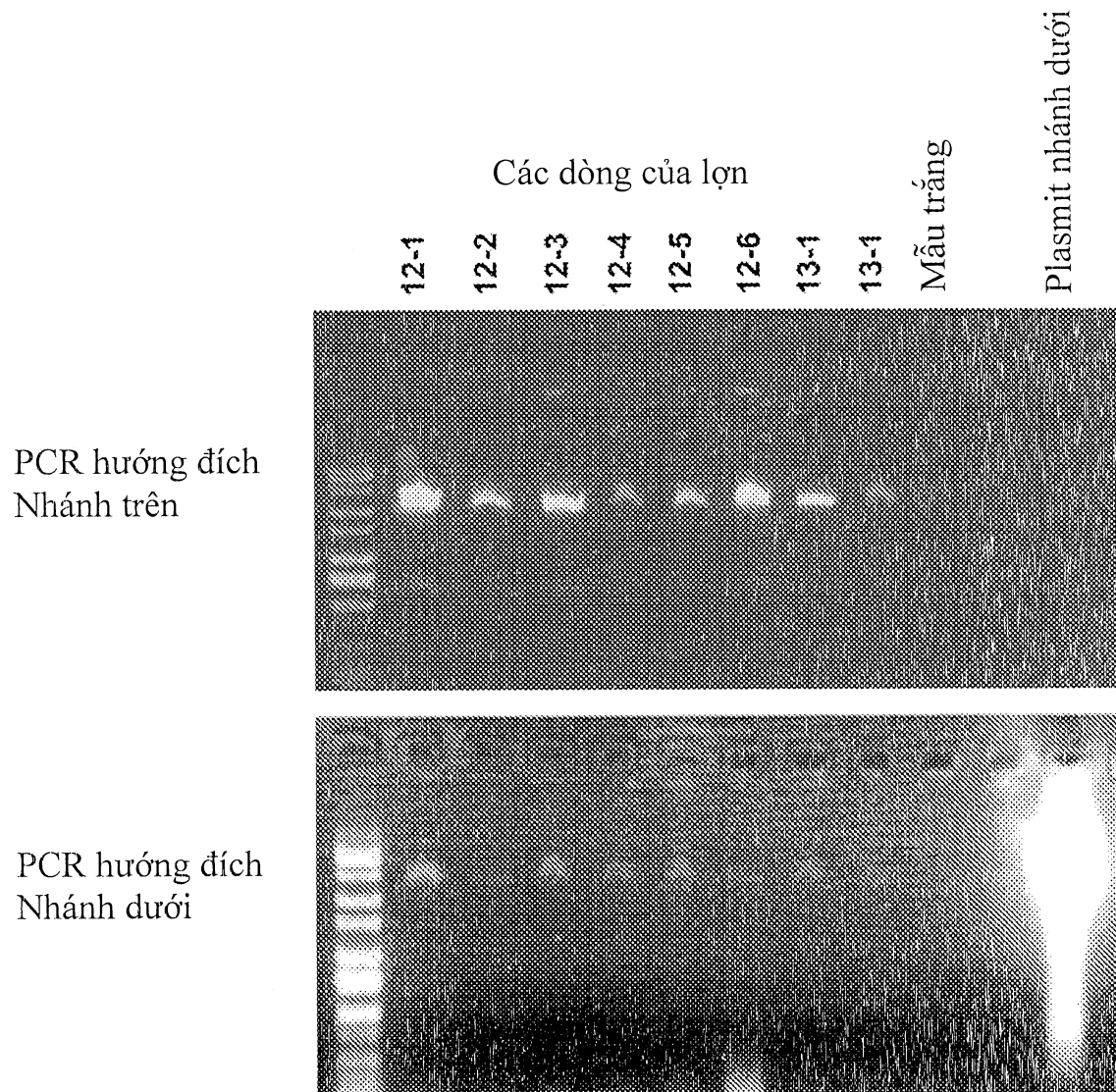
Hình 2

Tổ chức gen sialoadhesin và thiết kế vector hướng đích



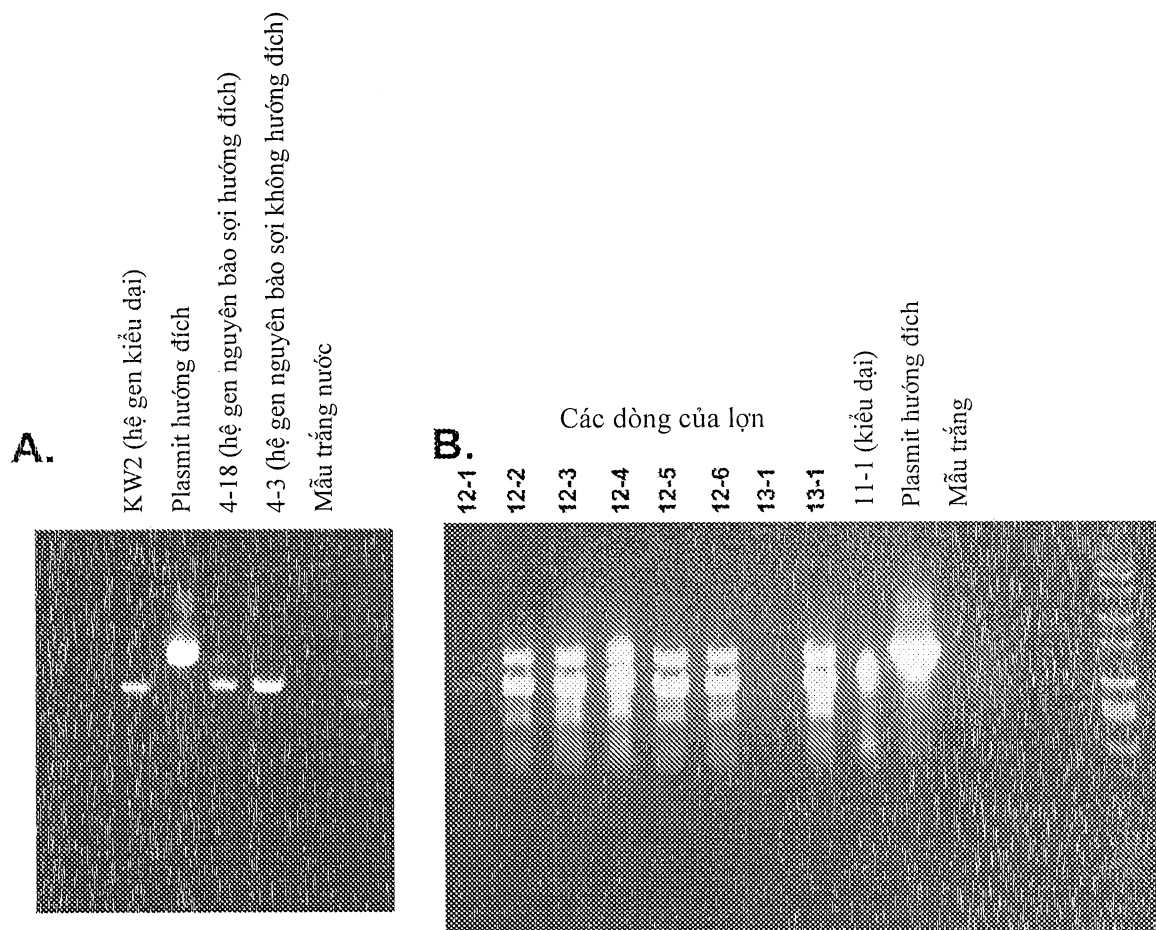
Hình 3

Sàng lọc bằng PCR để xác định sự hướng đích gen sialoadhesin

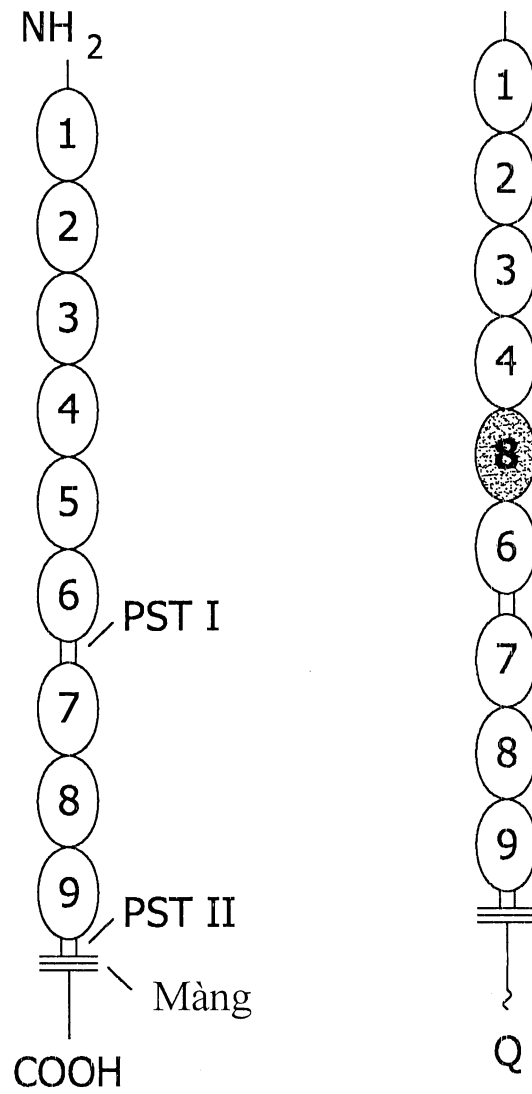


Hình 4

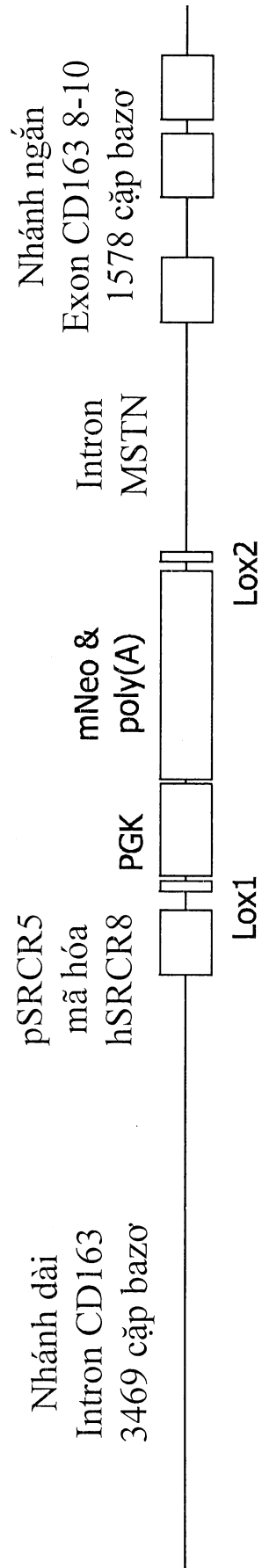
Sàng lọc bằng PCR để xác định sự có mặt ngang bằng của cả alen sialoadhesin kiểu đại và loại được hướng đích



Hình 5



Hình 6



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Missouri
Prather, Randall

<120> LỢN BIẾN ĐỔI GEN KHÁNG VIRUT GÂY HỘI CHỨNG HÔ HẤP VÀ SINH SẢN Ở
LỢN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA LỢN BIẾN ĐỔI GEN NÀY

<130> 11UMC053 (UMO11053.WO)

<150> US 61/519,076

<151> 2011-05-16

<160> 8

<170> Phiên bản PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 1

ggaacaggct gagccaataa

20

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 2

gcattcctag gcacagc

17

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 3

ggtttctaagt actgtggttt cc

22

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 4

agaggccact tgtgtagcgc

20

<210> 5

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 5

ctccttgcca tgtccag

17

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 6

caggtaccag gaaaaacggg t

21

<210> 7

<211> 360

<212> ADN

<213> Chuột nhắt nhà Mus musculus

<400> 7

gccagaccac atgggggtgtc tccagtccca agaattgtgca gggcttgctg ggatcctgcc

60

tgctcattcc ctgcatcttc agctaccctg ccgatgtccc agtgtccaat ggcatcacag

120

ccatctggta ctatgactac tcgggcaagc ggcaggtggt aatccactca ggggacccca

180

agctgggtgga caagcgtttc aggggtcgag ctgaactgat ggggaacatg gaccacaagg

240

tgtgcaacct gttgctcaaa gacttgaagc ctgaagactc tggcacctac aacttccgct

300

ttgagatcag tgatagcaac cgctgggttag atgtcaaagg caccacggtc actgtgacaa

360

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà *Mus musculus*

<400> 8

Gln	Thr	Thr	Trp	Gly	Val	Ser	Ser	Pro	Lys	Asn	Val	Gln	Gly	Leu	Ser
1				5					10					15	

Gly	Ser	Cys	Leu	Leu	Ile	Pro	Cys	Ile	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	Asp	Val
			20					25					30		

Pro	Val	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Ser	Gly
		35					40					45			

Lys	Arg	Gln	Val	Val	Ile	His	Ser	Gly	Asp	Pro	Lys	Leu	Val	Asp	Lys
	50					55					60				

Arg	Phe	Arg	Gly	Arg	Ala	Glu	Leu	Met	Gly	Asn	Met	Asp	His	Lys	Val
65					70					75					80

Cys	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr
				85					90					95	

Asn	Phe	Arg	Phe	Glu	Ile	Ser	Asp	Ser	Asn	Arg	Trp	Leu	Asp	Val	Lys
			100					105					110		

Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Thr
						115