



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

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

(11)



1-0024471

(51)⁷ C07K 14/11; A61K 39/145; A61P 31/16 (13) B

(21) 1-2014-02850

(22) 28/01/2013

(86) PCT/US2013/023441 28/01/2013

(87) WO2013/112995 01/08/2013

(30) 13/385,004 27/01/2012 US

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/11/2014 320A

(73) NEWPORT LABORATORIES, INC. (US)

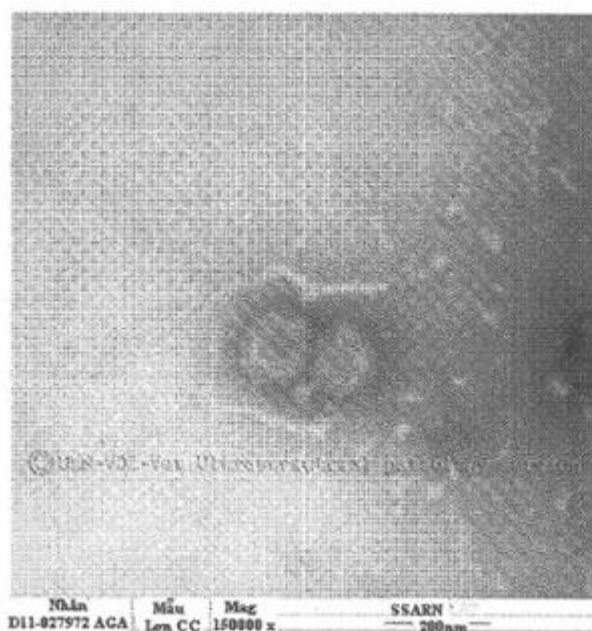
1520 Prairie Drive, Worthington, Minnesota 56187, United States of America

(72) SIMONSON, Randy, R. (US); COLLIN, Emily, A. (US); HAUSE, Benjamin, M. (US).

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

(54) VACXIN BẢO VỆ ĐỘNG VẬT CÓ VÚ KHÁNG LẠI SỰ LÂY NHIỄM VIRUT CÚM C

(57) Sáng chế đề cập đến vacxin bảo vệ động vật có vú kháng lại sự lây nhiễm virus cúm C, chứa chất mang được dùng và lượng có tác dụng miễn dịch của virus cúm C ở lợn được bất hoạt bằng etylenimin hai chức và chất bổ trợ dạng dầu trong nước; trong đó virus này chứa ít nhất một axit nucleic mã hóa tám polypeptit của virus cúm C (PB1, PB2, P3, HE, NP, M, NS1 và NS2) có các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO. 11, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO. 15, SEQ ID NO. 17 và SEQ ID NO. 18.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin bảo vệ động vật có vú kháng lại sự lây nhiễm virus cúm C.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus cúm C là tác nhân gây bệnh phổ biến cho người, với hầu hết đối tượng bị lây nhiễm là trẻ em. Virus cúm C gây bệnh hô hấp nhẹ giống như cảm lạnh thông thường. Có một báo cáo về virus cúm C được phân lập từ lợn ở Trung Quốc (Yuanji and Desselberger 1984, J. Gen. Virol. 65:1857-72). Nghiên cứu này cũng cho thấy các virus cúm C phân lập được từ lợn có thể lây nhiễm và lây truyền giữa các con lợn. Một số nghiên cứu khác đã xác định được các kháng thể ở lợn phản ứng với virus cúm C, điều này gợi ý rằng hoặc lợn là vật mang virus cúm C hoặc người thường rất hay lây truyền virus này cho lợn (Kimura et al. 1997, Virus Res. 48:71-9; Yamaoka et al. 1991, J Gen Virol. 72:711-714; Brown et al. 1995, Epidemiol. Infect. 114:511-20; Ohwada et al. 1987, Microbiol Immunol. 31:1173-80).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do được ghi nhận chỉ trong một bài báo, virus cúm C là hiếm gặp ở lợn. Virus phân lập được theo sáng chế là biến thể rất khác biệt của virus cúm C. Độ tương đồng tổng thể của virus này so với virus cúm C đã biết chỉ bằng khoảng 65%, cho thấy đây là dòng virus hoàn toàn mới và có mối liên hệ di truyền xa với các virus đã biết. Độ tương đồng thấp này gợi ý rằng các vaccin kháng virus cúm C thông thường ở người sẽ không có khả năng kháng lại virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 theo sáng chế. Đã phát hiện thấy rằng các cặp môi “thông dụng” của virus cúm C cũng không thể phát hiện được virus này. Ngoài ra, đã phát hiện thấy hiệu giá kháng thể ở người và lợn, cũng như khả năng tái bản của virus ở cả lợn lẫn chồn sương, điều này cho thấy rằng virus theo sáng chế có khả năng gây bệnh cho lợn và người. Các tác giả sáng chế nhận thấy rằng có thể tạo ra vaccin có khả năng bảo vệ cả người lẫn lợn khỏi bị lây nhiễm virus cúm C.

Theo khía cạnh thứ nhất, mục đích của sáng chế là đề cập đến vaccin bảo vệ động vật có vú kháng lại sự lây nhiễm virus cúm C, chứa chất mang được dụng và lượng có tác

dụng miễn dịch của virus cúm C ở lợn được bất hoạt bằng etylenimin hai chức và chất bổ trợ dạng dầu trong nước; trong đó virus này chứa ít nhất một axit nucleic mã hóa tám polypeptit của virus cúm C (PB1, PB2, P3, HE, NP, M, NS1 và NS2) có các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.18.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến virus cúm C có độ tương đồng rất thấp với virus cúm C đã biết. Nghiên cứu thử nghiệm miễn dịch cho thấy virus này có thể lây nhiễm sang lợn và lan truyền giữa các con lợn. Ngoài ra, virus cúm C thường được coi là tác nhân gây bệnh cho người, và các nghiên cứu huyết thanh học được thực hiện đã phát hiện được các kháng thể kháng virus này ở cả lợn lẫn người. Kết quả nghiên cứu cho thấy có khoảng 10% lợn và 30% người có kháng thể kháng virus này. Dữ liệu thử nghiệm bổ sung cho thấy virus này có thể lây nhiễm và lan truyền ở chồn sương (được sử dụng thay thế cho người trong các nghiên cứu lây nhiễm).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến một phần bộ gen của virus cúm C này.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện virus cúm C này ở động vật.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 là ảnh chụp thể hiện virus cúm C theo sáng chế bằng kính hiển vi điện tử.

Fig.2 là đồ thị thể hiện hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu ở lợn được chủng ngừa và lợn không được chủng ngừa.

Fig.3 là đồ thị thể hiện các trị số ngưỡng phát hiện của phân tích PCR thời gian thực ở lợn được chủng ngừa và lợn không được chủng ngừa.

Fig.4 là đồ thị thể hiện số lượng chồn sương lây nhiễm thông qua nuôi cấy mô được thử nghiệm miễn dịch bằng virus theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phân lập virus cúm C theo sáng chế

Các mẫu nghiên cứu tại Newport Laboratories là các mẫu nước mũi của lợn có biểu hiện nhiễm bệnh cúm. Kết quả phân tích bằng phương pháp PCR thời gian thực phiên mã ngược cho thấy các mẫu này đều âm tính với virus cúm A. Lượng mẫu nhất

định được ủ với các tế bào tinh hoàn đơn lớp hợp lưu của lợn (Swine Testicle-ST) để làm tăng số lượng virus bất kỳ có mặt. Sau 5 ngày, dấu hiệu bệnh lý tế bào thể hiện rõ rệt, chứng tỏ rằng virus đã sinh trưởng trong các tế bào tinh hoàn của lợn. Các mẫu chứa phần dịch nổi nuôi cấy tế bào được phân tích bằng phương pháp PCR thời gian thực và cho kết quả âm tính với virus cúm A. Phần dịch nổi nuôi cấy tế bào được phân tích để đánh giá khả năng ngưng kết hồng cầu ở gà tây (thử nghiệm ngưng kết hồng cầu). Thử nghiệm ngưng kết hồng cầu được thực hiện theo quy trình sau (Thử nghiệm 1).

Thử nghiệm 1

1.0 Mục đích thử nghiệm

Để định lượng virus cúm C ở lợn theo sáng chế.

2.0 Vật liệu nghiên cứu

- Giá đựng pipet
- Đĩa nuôi cấy 96-giếng đáy hình chữ V
- Pipet đa kênh và đầu côn (10-200 μ L)
- Pipet 100-1000 μ L
- Pipet 10-100 μ L
- Đầu côn pipet
- Trang thiết bị bảo hộ (áo khoác phòng thí nghiệm, kính bảo hộ, găng tay)
- Tủ an toàn sinh học
- Tấm/nắp đáy
- Đồng hồ đo
- Ống faccon 50 mL
- Máy ly tâm

3.0 Thuốc thử/Môi trường

- Tế bào hồng cầu của gà tây (TRBC-Turkey Red Blood Cell) do Lampire cung cấp
- DPBS 1X

4.0 Công thức môi trường

Dung dịch chứa tế bào hồng cầu của gà tây (0,5%)

- TRBC trong dung dịch Alsevers. Ly tâm trong các bình nón dung tích 50mL ở tốc độ 2000 vòng/phút trong 10 phút. Hút và loại bỏ phần dịch nổi.

- Rửa tế bào hồng cầu bằng cách bổ sung DPBS 1X với thể tích bằng thể tích máu ban đầu. Lật ngược và lắc nhẹ. Ly tâm và loại bỏ phần dịch nổi. Lặp lại hai lần. Bảo quản các tế bào hồng cầu đặc ở nhiệt độ 4°C.

- Bổ sung 50mL DPBS 1X vào bình dung tích 50mL. Hút ra 250μL PBS 1X. Bổ sung 250μL tế bào hồng cầu đặc ở gà tây vào. Trộn nhẹ. Mỗi đĩa nuôi cấy cần 5mL. Bảo quản tế bào hồng cầu đã pha loãng ở nhiệt độ 4°C.

5.0 Quy trình

Chuẩn bị

- Tám mẫu sẽ được chạy theo chiều ngang trên đĩa 96-giếng. Dự tính số lượng đĩa cần sử dụng dựa trên số lượng mẫu cần kiểm tra và ghi vào sổ làm việc.

- Theo phương thức khác: Mười hai mẫu có thể được chạy theo chiều dọc trên đĩa 96-giếng.

Quy trình thử nghiệm

- Bổ sung 50μL DPBS vào toàn bộ các giếng của các đĩa nuôi cấy.
- Nạp 50μL mẫu 1 vào giếng A1; mẫu 2 vào giếng B1, v.v.
- Với mỗi nhóm đĩa thử nghiệm, chạy mẫu đối chứng âm trên đĩa cuối cùng (chỉ chứa DBPS).

- Pha loãng các đĩa bắt đầu từ cột 1 đến cột 12 bằng 50μL (không bao gồm hàng mẫu đối chứng âm), loại bỏ 50μL còn lại.

- Sau khi đĩa được pha loãng, nạp 50μL TRBC 0,5% vào toàn bộ các giếng (lật ngược ống để đảo trộn các tế bào hồng cầu, không lắc xoáy). Lắc nhẹ các đĩa, đậy nắp và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

- Theo phương thức khác: Để chạy mười hai mẫu theo chiều dọc, nạp 50μL mẫu 1 vào giếng A1; mẫu 2 vào A2.

- Pha loãng các đĩa bắt đầu từ hàng A đến hàng H bằng 50 μ L (không bao gồm cột mẫu đối chứng âm), loại bỏ 50 μ L còn lại.

- Sau khi đĩa được pha loãng, nạp 50 μ L TRBC 0,5% vào toàn bộ các giếng (lật ngược ống để đảo trộn các tế bào hồng cầu, không lắc xoáy). Lắc nhẹ các đĩa, đặt nắp và ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

6.0 Đọc kết quả

- Nghiêng các đĩa một góc 30° đến 45° để đọc. Khi đọc, điểm kết thúc là khi giếng cuối cùng hoàn toàn không có hình giọt nước. Ghi chú lại vào sổ làm việc.

- Hiệu giá ngưng kết hồng cầu (HA) được ghi chú lại vào sổ làm việc.

- Hàng mẫu đối chứng âm (hoặc cột đối chứng âm) hoàn toàn không có hình giọt nước, cho thấy không có sự ngưng kết hồng cầu.

Virut chưa xác định được này có khả năng ngưng kết hồng cầu với hiệu giá bằng 1280. Nhiều virut chứa gen mã hóa protein hemagglutinin cho phép gắn kết virut với các tế bào, bao gồm cả tế bào hồng cầu. Các virut cúm có khả năng ngưng kết tế bào hồng cầu.

Thử nghiệm 2

Bình chứa các tế bào tinh hoàn lợn bị lây nhiễm virut chưa biết nêu trên được gửi đến University of Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory để phân tích bằng kính hiển vi điện tử. Hình ảnh phân tích cho thấy virut này thuộc họ virut cúm (*Orthomyxoviridae*) (Fig.1). Họ này bao gồm virut cúm A, B, C và virut *thogoto*.

Thử nghiệm 3

Phân tích PCR được thực hiện với các đoạn môi được thiết kế để phát hiện đặc hiệu virut cúm A, virut cúm B hoặc virut cúm C (Bảng 1). Tất cả các phản ứng PCR cho kết quả âm tính. Ngoài ra, thử nghiệm đánh giá hoạt tính neuraminidaza được thực hiện bằng cách sử dụng cơ chất của neuraminidaza là axit metylumbelliferyl N-axetylneuraminic. Kết quả thử nghiệm cho thấy virut này không có hoạt tính neuraminidaza (cả virut cúm A lẫn virut cúm B đều có hoạt tính neuraminidaza). Tiếp theo, thử nghiệm đánh giá hoạt tính esteraza được thực hiện với cơ chất là 4-nitrophenyl axetat (Sigma Aldrich N8130). Kết quả thử nghiệm cho thấy virut này có hoạt tính esteraza. Virut cúm C và một số virut thuộc họ *Coronaviridae* có khả năng ngưng kết

hồng cầu và có hoạt tính esteraza. Mặc dù phản ứng PCR là âm tính với virus cúm C, nhưng căn cứ vào hoạt tính hemagglutinin esteraza và ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử, đã xác định sơ bộ được virus theo sáng chế là virus cúm C.

Bảng 1. Đoạn mồi và mẫu dò được sử dụng trong phân tích PCR thời gian thực phiên mã ngược để phát hiện virus theo sáng chế (IABkQ = Iowa black hole quencher-đoạn trình tự kết thúc Iowa)

Virus	Đoạn mồi xuôi	Đoạn mồi ngược	Mẫu dò
Virus cúm A ở lợn	AGATGAGTCTTCTAACCG AGGTCG	TGCAAAAACATCTTCAAG TCTCTG	5'-Cy3-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-3'- IABkQ
Virus cúm B ở người	TCCTCAACTCACTCTTCG AGCG	CGGTGCTCTTGACCAAAT TGG	5'-FAM-CCA ATT CGA GCA GCT GAA ACT GCG GTG-3'-IABkQ
Virus cúm C ở người	ATTGAGAGCAGGAACGAC TG	TCTTAAAGGCCAGGAAA CG	5'-FAM- CCCCTCTGGAAAGAGCCA TGCAA-3'-IABkQ

Thử nghiệm 4

Giải trình tự bộ gen của virus cúm C theo sáng chế

Virus theo sáng chế được nuôi cấy tăng sinh trong canh trường tế bào để tạo ra 200mL dịch nuôi cấy tế bào có hiệu giá ngưng kết hồng cầu (hemagglutination - HA) bằng 2560. Dịch nuôi cấy tế bào được lọc qua màng lọc 0,2µm để loại bỏ xác tế bào. Sau đó, dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 110.000xg trong 3 giờ để tạo hạt virus. Sau đó, virus này được huyền phù hóa lại trong 1mL dung dịch muối đệm phosphat và phân giải bằng DNaza (New England Biolabs M0303S) và ARNza (New England Biolabs M0243S) ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau đó, dung dịch virus này được phân lớp nhẹ ở phía trên 35mL dung dịch sucroza 25% và ly tâm trong 3 giờ ở tốc độ 110.000xg để tạo hạt virus này. ARN virus được chiết xuất từ hạt virus này bằng Kit QiagenTM Viral ARN Mini (Qiagen, Inc., 27220 Turnberry Lane Suite 200 Valencia, CA 91355) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, hạt virus này được huyền phù hóa lại trong 700µL dung dịch đệm AVL chứa chất mang ARN và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, 560µL ethanol được bổ sung vào mẫu này, sau đó mẫu này được nạp vào cột QIAampTM kích cỡ nhỏ bằng cách ly tâm ở tốc độ 6000 x g. Tiếp theo, cột này lần lượt được rửa bằng 500µL dung dịch đệm AW1 và dung dịch đệm AW2, làm khô bằng cách ly tâm ở tốc độ 14.000 xg trong 2 phút, sau đó pha loãng bằng 60µL nước. tiếp theo ADN bổ sung (ADN bổ sung) được phiên mã ngược từ ARN virus này bằng Kit phiên mã ngược Promega

(Promega Corp., 2800 Woods Hollow Rd., Madison WI 53711; www.promega.com) với các đoạn môi được thiết kế ngẫu nhiên. Hệ thống phiên mã ngược GoScript™ là kit chuyên dụng, bao gồm transcriptaza phiên mã ngược và bộ thuốc thử được thiết kế tối ưu để tổng hợp hiệu quả sợi ADN bổ sung đầu tiên trong chu trình khuếch đại PCR. Các thành phần của hệ thống phiên mã ngược GoScript™ có thể được sử dụng để phiên mã ngược các khuôn ARN bắt đầu với ARN tổng số, poly(A) và ARNtt (ARN thông tin) hoặc bản sao ARN phiên mã tổng hợp.

Tiếp theo, ADN bổ sung được phân cắt trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C bằng RNazaH (New England Biolabs M0297S) để loại bỏ ARN ra khỏi phức hợp ARN-ADN bổ sung. ADN bổ sung sợi đơn được tạo sợi kép bằng cách sử dụng đoạn Klenow từ ADN polymeraza (New England Biolabs M0210S).

ADN bổ sung sợi kép này được siêu âm bằng hệ thống BioRuptor® (Diagenode Inc. North America, 376 Lafayette Rd., Suite 102, Sparta, NJ 07871), để phân cắt ADN bổ sung của virus này. Sau đó, đoạn ADN bổ sung đã phân cắt được sử dụng để thiết kế thư viện ADN bổ sung bằng Kit Life Technologies™ Ion Plus Fragment Library (www.lifetechnologies.com) như sau: 50µL ADN bổ sung đã phân cắt được trộn với 108µL nước không chứa nucleaza, 40µL dung dịch đệm sửa chữa cuối cùng 5X (End Repair Buffer), và 2µL enzym sửa chữa cuối cùng (End Repair Enzyme). Hỗn hợp phản ứng này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Sau khi ủ, 360µL hạt từ Agencourt® Ampure® được bổ sung vào mẫu, sau đó đặt vào máy lắc ở tốc độ 8 đến 10 vòng/phút trong 10 phút. Mẫu này được lắc xoáy và đặt vào giá từ DynaMag™-2. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, phần dịch nổi được hút và loại bỏ. Sau đó, mẫu được rửa hai lần theo quy trình sau. 500µL etanol 70% tinh khiết được bổ sung vào mẫu và không nhắc mẫu khỏi giá từ. Ống chứa mẫu được lắc hai lần trên giá từ để di chuyển các hạt từ xoay tròn. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, etanol được loại bỏ. Quy trình rửa này được lặp lại. Sau khi rửa lần 2 bằng etanol 70% và loại bỏ phần dịch nổi, ống chứa mẫu được lắc xoáy và đặt trở lại giá từ. Phần etanol dư được hút bỏ và mẫu được làm khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 5 phút. 50µL dung dịch TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH = 8,0) được bổ sung vào hỗn hợp chứa ADN bổ sung này, lắc xoáy, tạo xung, và đặt trở lại giá từ. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, phần dịch nổi chứa ADN bổ sung được rửa giải được chuyển vào ống LoBind mới có dung tích 1,5mL.

20 μ L dung dịch đệm Ligaza 10X, 77 μ L nước không chứa nucleaza, 50 μ L nhân tố liên kết nhân tạo (adapter), và 3 μ L ADN Ligaza được trộn với 50 μ L ADN bổ sung. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, phần dịch nổi được hút và loại bỏ. Sau đó, mẫu được rửa hai lần theo quy trình sau: 500 μ L etanol 70% tinh khiết được bổ sung vào mẫu và không nhấc mẫu khỏi giá từ. Ống chứa mẫu được lắc hai lần trên giá từ để di chuyển các hạt từ xoay tròn. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, etanol được loại bỏ. Quy trình rửa này được lặp lại. Sau khi rửa lần 2 bằng etanol 70% và loại bỏ phần dịch nổi, ống chứa mẫu được lắc xoáy và đặt trở lại giá từ. Phần etanol dư được hút bỏ và mẫu được làm khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 5 phút. 30 μ L dung dịch TE 1X được bổ sung vào hỗn hợp chứa ADN bổ sung này, lắc xoáy, tạo xung, và đặt trở lại giá từ. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, phần dịch nổi chứa ADN bổ sung được rửa giải được chuyển vào ống LoBind mới có dung tích 1,5mL.

Toàn bộ 30 μ L ADN bổ sung được chuyển vào gel agaroza 2% và điện di trong 80 phút ở điện thế bằng 110V. Sau khi điện di trên gel, mẫu này được sàng lọc kích cỡ đối với 180 đến 210 cặp bazơ. Thư viện ADN bổ sung đã sàng lọc kích cỡ được tinh chế trên gel bằng Kit QIAquickTM PCR (Qiagen, Inc., 27220 Turnberry Lane Suite 200 Valencia, CA 91355; www.qiagen.com) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đoạn ADN bổ sung được phân cắt của gel này được xác định trọng lượng phân tử và 3 thể tích dung dịch đệm QG so với 1 thể tích gel được bổ sung vào. Hỗn hợp này được ủ trên máy lắc ở nhiệt độ phòng cho đến khi mảnh gel được hòa tan hoàn toàn. Khi mảnh gel đã được hòa tan hoàn toàn, dung dịch này được nạp vào cột lọc QIAquickTM (Qiagen, Inc., 27220 Turnberry Lane Suite 200 Valencia, CA 91355; www.qiagen.com) được trang bị ống thu mẫu có dung tích 2 μ L và ly tâm ở tốc độ tối đa (khoảng 16.000 vòng/phút) trong 1 phút. Dòng chảy xuyên qua được loại bỏ và cột QIAquickTM được đặt trở lại vào ống thu mẫu tương tự. Cột chứa ADN bổ sung được rửa bằng cách bổ sung 750 μ L dung dịch đệm PE vào cột và ly tâm ở tốc độ tối đa trong 1 phút. Dòng chảy xuyên qua được loại bỏ và cột QIAquick được đặt trở lại vào ống thu mẫu tương tự và ly tâm trong 4 phút ở tốc độ tối đa. Sau đó, cột QIAquickTM được đặt vào ống ly tâm sạch có dung tích 1,5mL. 40 μ L dung dịch đệm EB được bổ sung vào màng cột QIAquickTM và ủ ở nhiệt độ phòng trong vài phút trước khi ly tâm cột này trong 1 phút để rửa giải ADN bổ sung.

Thư viện ADN bổ sung đã sàng lọc kích cỡ và rửa giải được dịch khác và khuếch đại bằng Kit Life Technologies™ Ion Plus Fragment Library (www.lifetechnologies.com). 40µL ADN bổ sung đã sàng lọc kích cỡ được trộn với 200µL Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity và 10µL hỗn hợp mồi khuếch đại. 125µL hỗn hợp này được chuyển vào từng ống PCR và chạy trên thiết bị PCR theo các thông số sau:

Bảng 2: Các thông số của thiết bị PCR

Giai đoạn	Công đoạn	Nhiệt độ	Thời gian
Giữ	Dịch khác	72°C	20 phút
Giữ	Biến tính	95°C	5 phút
Chạy phản ứng (10 chu kỳ)	Biến tính	95°C	15 giây
	Gắn mồi	58°C	15 giây
	Tổng hợp	72°C	1 phút
Giữ	--	4°C	∞

Các mẫu được nạp vào ống ly tâm mới có dung tích 1,5mL và tinh chế bằng cách bổ sung 375µL hạt từ Agencourt Ampure® vào mẫu và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, trên máy lắc. Các mẫu được lắc xoáy và đặt vào giá từ DynaMag™-2. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, phần dịch nổi được hút và loại bỏ. Sau đó, mẫu được rửa hai lần theo quy trình sau. 500µL etanol 70% tinh khiết được bổ sung vào mẫu và không nhấc mẫu khỏi giá từ. Ống chứa mẫu được lắc hai lần trên giá từ để di chuyển các hạt từ xoay tròn. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, etanol được loại bỏ. Quy trình rửa này được lặp lại. Sau khi rửa lần 2 bằng etanol 70% và loại bỏ phần dịch nổi, ống chứa mẫu được lắc xoáy và đặt trở lại giá từ. Phần etanol dư được hút bỏ và mẫu được làm khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 5 phút. 50µL dung dịch TE 1X được bổ sung vào hỗn hợp chứa ADN bổ sung này, lắc xoáy, lắc rung, và đặt trở lại giá từ. Sau khi dung dịch phản ứng trở nên trong suốt, phần dịch nổi chứa ADN bổ sung được rửa giải được chuyển vào ống LoBind mới có dung tích 1,5mL.

Hàm lượng ADN bổ sung được định lượng bằng Kit Ion Library Quantitation (www.lifetechnologies.com) theo theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 5 dung dịch pha loãng 10 lần liên tiếp được điều chế từ thư viện *E. coli* DH10B đối chứng theo Bảng 3.

Bảng 3: Dung dịch pha loãng từ thư viện *E. coli* DH10B đối chứng.

Dung dịch chuẩn	Thư viện đối chứng	Nước không chứa nucleaza	Tỷ lệ pha loãng
1	5 μ L (không pha loãng)	45 μ L	0,1
2	5 μ L dung dịch chuẩn 1	45 μ L	0,01
3	5 μ L dung dịch chuẩn 2	45 μ L	0,001
4	5 μ L dung dịch chuẩn 3	45 μ L	0,0001
5	5 μ L dung dịch chuẩn 4	45 μ L	0,00001

Dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:20 của thư viện mẫu trong nước không chứa nucleaza được điều chế. Sau đó, các dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 và 1:20000 được điều chế như được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Dung dịch pha loãng từ thư viện mẫu

Tỷ lệ pha loãng	Thư viện	Nước không chứa nucleaza
1:2000	1 μ L dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:20	99 μ L
1:20000	5 μ L dung dịch pha loãng theo tỷ lệ 1:2000	45 μ L

Do mỗi phản ứng PCR thời gian thực được lặp lại ba lần, nên hỗn hợp phản ứng được điều chế bằng cách trộn 250 μ L hỗn hợp Ion Library TaqMan® qPCR 2X, 25 μ L Ion Library TaqMan® Quantitation Assay 20X, và 100 μ L nước không chứa nucleaza cho mỗi phản ứng PCR thời gian thực. Đối với mỗi phản ứng, 15 μ L hỗn hợp phản ứng được hút bằng pipet và chuyển vào giếng của đĩa PCR. 5 μ L thư viện mẫu hoặc thư viện đối chứng đã pha loãng được bổ sung vào mỗi giếng tương ứng. 5 μ L nước không chứa nucleaza được sử dụng làm mẫu đối chứng không chứa khuôn (NTC). Các giếng được bịt kín, ly tâm nhanh, và chạy phản ứng PCR thời gian thực theo các điều kiện sau.

Bảng 5: Điều kiện thực hiện phản ứng PCR thời gian thực

Giai đoạn	Nhiệt độ	Thời gian
Giữ	50°C	2 phút
Giữ	95°C	20 giây
Chạy phản ứng (40 chu kỳ)	95°C	3 giây
	60°C	30 giây

Tỷ lệ pha loãng khuôn được tính theo phương trình sau:

Tỷ lệ pha loãng khuôn = [(tỷ lệ tương đối của PCR thời gian thực) * (tỷ lệ pha loãng thư viện mẫu)]/0,32

Mẫu được pha loãng và điều chế theo phương trình nêu trên để giải trình tự bằng Kit Ion Xpress™ Template v2.0 (www.lifetechnologies.com). Chế phẩm nhũ tương dầu™ được lấy ra từ tủ lạnh và trộn đều. 9mL chế phẩm nhũ tương dầu™ được bổ sung

vào ống IKA® DT-20. Ống IKA® đã được nạp đầy này được đặt vào nước đá cho đến khi sử dụng. Hỗn hợp phản ứng PCR được điều chế bằng cách trộn 582µL nước không chứa nucleaza, 200µL hỗn hợp thuốc thử PCR 5x, 100µL hỗn hợp enzym PCR 10x, 100µL hạt Ion Sphere (lắc xoáy trong 1 phút trước khi bổ sung), và 18µL thư viện mẫu đã pha loãng. Hỗn hợp này được lắc xoáy trong 5 giây và đặt sang bên cạnh, trong khi đó ống IKA® DT-20 chứa chế phẩm nhũ tương dầu được đặt vào thiết bị IKA® Ultra-Turrax® và khóa tại chỗ. Nhãn dính trên nắp ống IKA® DT-20 được gỡ bỏ để lộ cửa nạp mẫu. Ấn nút **START** trên thiết bị IKA® Ultra-Turrax® và toàn bộ lượng hỗn hợp phản ứng PCR được nạp qua miệng nắp màu xanh của ống IKA® DT-20. Sau khi trộn trong 5 phút trên thiết bị IKA® Ultra-Turrax®, nhũ tương này được đặt vào nước đá trong khoảng 5 phút. Đầu côn có kích cỡ miệng hút rộng được tạo ra bằng cách cắt khoảng 5mm từ đầu côn pipet để hút nhũ tương này. Nhũ tương này được hút và chuyển vào mỗi giếng của đĩa PCR 96-giếng với thể tích 100µL, cho đến khi khoảng 90 giếng được nạp đầy bằng Pipet Eppendorf® Repeater® được lắp với đầu côn có kích cỡ miệng hút rộng. Đĩa 96-giếng này được đậy nắp và chạy trên thiết bị PCR theo các thông số như sau:

Bảng 6: Các thông số PCR để giải trình tự

Giai đoạn	Công đoạn	Nhiệt độ	Thời gian
Giữ	Biến tính	94°C	6 phút
Chạy phản ứng (40 chu kỳ)	Biến tính	94°C	30 giây
	Gắn mồi	58°C	30 giây
	Tổng hợp	72°C	90 giây
Chạy phản ứng (5 chu kỳ)	Biến tính	94°C	30 giây
	Tổng hợp	68°C	6 phút
Giữ			

Sau khi thực hiện phản ứng PCR, mặc dù số lượng giếng nhiều, nhưng mẫu có thể được hút bằng pipet đa kênh và giá đỡ pipet đa kênh. Khoảng 1,2mL nhũ tương được chuyển vào mỗi ống trong số sáu ống ly tâm có dung tích 1,5mL. Toàn bộ sáu ống ly tâm được ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 15.500 xg để thu lấy nhũ tương. Trong quá trình ly tâm, dung dịch phân giải™ được điều chế bằng cách trộn 2mL dung dịch thu hồi™ và 6mL 1-butanol. Sau đó, dung dịch phân giải™ được lắc xoáy trong khoảng 1 phút cho đến khi thu được dung dịch nhũ tương trắng mịn. Sau khi ly tâm nhũ tương này, pha dầu trong suốt ở trên cùng của mỗi ống được loại bỏ. Sáu ống chứa nhũ tương trắng này được xử lý bằng 1mL dung dịch phân giải™, lắc xoáy trong 30 giây, và ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 15.500 xg. Sau khi ly tâm, pha hữu cơ trên cùng của mỗi ống được loại bỏ. Mỗi ống mẫu đã chứa 1mL dung dịch thu hồi™, được lắc xoáy trong 30 giây, sau đó ly tâm

trong 3 phút ở tốc độ 15.500 xg. Phần dịch nổi từ mỗi ống được loại bỏ cho đến khi chỉ còn lại khoảng 100 μ L. Các hạt kết tủa trong toàn bộ sáu ống được huyền phù hóa lại và chuyển vào ống ly tâm mới có dung tích 1,5mL bằng cùng đầu côn pipet. Ba trong số các ống ban đầu này được rửa một lần bằng 200 μ L dung dịch thu hồiTM. Sau khi ống thứ ba được rửa, dung dịch rửa được chuyển vào ống chứa các hạt kết tủa đã tái huyền phù hóa và gom lại này. Quy trình này được lặp lại đối với ba ống còn lại.

Dung dịch thu hồiTM được bổ sung vào ống thu gom này cho đến khi tổng thể tích bằng 1,5mL. Sau đó, ống này được lắc xoáy trong 30 giây và ly tâm ở tốc độ 15.500 xg trong 3 phút. Phần dịch nổi được loại bỏ cho đến khi chỉ còn lại khoảng 100 μ L. Phần còn lại được tái huyền phù hóa và chuyển vào ống ly tâm mới có dung tích 1,5mL. 100 μ L dung dịch rửaTM được bổ sung vào ống ban đầu này, rửa, sau đó chuyển vào ống ly tâm mới chứa mẫu này. Mẫu này được rửa hai lần bằng cách bổ sung 1mL dung dịch rửaTM, lắc xoáy trong 30 giây, sau đó ly tâm ống trong 3 phút ở tốc độ 15.500 xg. Phần dịch nổi được loại bỏ cho đến khi chỉ còn lại khoảng 100 μ L. Quy trình rửa này được lặp lại.

Quy trình làm giàu các hạt Ion SphereTM dương tính với khuôn được thực hiện bằng Kit Ion XpressTM Template v2.0 (www.lifetechnologies.com). Bình chứa hạt từ Dynabeads® MyOneTM Streptavidin C1 được lắc xoáy. 10 μ L hạt từ MyOneTM được chuyển vào ống ly tâm có dung tích 1,5mL, rửa bằng 70 μ L dung dịch rửaTM, lắc xoáy, và đặt vào giá từ trong 2 phút. Sau đó, phần dịch nổi được loại bỏ. Các hạt từ MyOneTM được tái huyền phù hóa trong 10 μ L dung dịch rửaTM mới, sau đó chuyển vào cùng ống chứa các hạt Ion SphereTM (ISPs). Để thực hiện việc bắt giữ này, 100 μ L dung dịch đệm gắn môiTM cũng được bổ sung vào ống mẫu, sau đó được đặt lên máy lắc trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Ống mẫu này được ly tâm và đặt vào giá từ cho đến khi dung dịch trong ống trở nên trong suốt. Phần dịch nổi được chuyển vào ống có ghi nhãn “Unbound”. Các hạt từ này được rửa hai lần bằng 200 μ L dung dịch rửaTM, trộn, và đặt trở lại giá từ trước khi phần dịch nổi được chuyển vào ống “Unbound”. Dung dịch rửa giảiTM được điều chế bằng cách trộn 200 μ L NaOH 1M, 16 μ L Tween® 20 10% trong nước dùng cho lĩnh vực sinh học phân tử, và 1,38 mL nước dùng cho lĩnh vực sinh học phân tử. Để rửa giải các hạt Ion Sphere ra khỏi các hạt từ Dynabeads® MyOneTM Streptavidin C1, 400 μ L dung dịch rửa giảiTM được bổ sung vào ống mẫu, trộn, sau đó đặt lên máy lắc trong 7 phút. Sau đó, phần dịch nổi được hút ra và chuyển vào ống có ghi nhãn “Enriched-1.” Ống “Enriched-1” được lắc xoáy, sau đó ly tâm ở tốc độ 15.500 xg trong 4 phút. Sau đó, toàn

bộ 100µL phần dịch nổi được loại bỏ. Tiếp theo, 1mL dung dịch rửa™ được bổ sung vào ống “Enriched-1”, lắc xoáy, và ly tâm ở tốc độ 15.500 xg trong 4 phút. Sau đó, một lần nữa toàn bộ 100µL phần dịch nổi được loại bỏ. Phần mẫu còn lại được trộn và ống “Enriched-1” được đặt trở lại giá từ. Sau vài phút, phần dịch nổi được hút ra và chuyển vào ống có ghi nhãn “Enriched-2.”

Quá trình giải trình tự ADN được thực hiện bằng Kit Life Technologies Ion Sequencing v2.0 (www.lifetechnologies.com). 50µL mẫu trong ống “Enriched-2” được chuyển vào ống PCR mới có dung tích 0,2mL. 5µL hạt Ion Spheres đối chứng và 150µL dung dịch đệm gắn môi™ được bổ sung vào và dung dịch này được trộn và ly tâm trong 2 phút ở tốc độ 15.500 xg. Phần dịch nổi được loại bỏ cho đến khi chỉ còn lại 9µL. 5µL đoạn môi giải trình tự™ được bổ sung vào mẫu và đặt vào thiết bị PCR để thực hiện một chu kỳ trong 2 phút ở nhiệt độ 95°C, sau đó 2 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, mẫu được lấy ra khỏi thiết bị PCR, trộn với 1 µL Polymeraza giải trình tự™, và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

Trong khi đó, chip mới được lấy ra và đặt vào bộ chuyển đổi ly tâm Ion™/máy lắc. 50µL isopropanol 100% được bổ sung vào cổng kích cỡ lớn của chip bằng đầu côn pipet Rainin® SR-L200F, sau đó được hút ra từ cổng còn lại. Chip được rửa hai lần bằng 50µL dung dịch đệm gắn môi™ được bổ sung vào cổng kích cỡ lớn của chip, sau đó được hút ra từ cổng còn lại.

Ấn nút “Experiment” trên bảng điều khiển của máy giải trình tự PGM™. Khi có câu lệnh nhắc, chip cũ được thay thế bằng chip mới. Máy quét mã vạch được sử dụng để quét mã vạch của chip trên bao bì. Sau khi mã vạch được nhập, ấn nút “Chip Check”. Sau khi kết thúc quá trình kiểm tra chip, ấn nút “Next” để thực hiện quá trình hiệu chỉnh chip. Sau khi hiệu chỉnh, chip được nhắc ra, đặt trở lại vào bộ chuyển đổi ly tâm Ion/máy lắc, và rửa bằng 50µL dung dịch đệm gắn môi được bổ sung vào cổng kích cỡ lớn của chip, sau đó được hút ra từ cổng còn lại., 7µL mẫu được nạp vào cổng kích cỡ lớn của chip bằng pipet Rainin® Pipette-Lite® LTS-20 với đầu côn Rainin® SR-L200F. Phần dịch lỏng được thay thế được hút ra từ cổng còn lại của chip. Sau đó chip Ion Chip™ được chuyển vào máy ly tâm và ly tâm trong 4 phút. Phần mẫu còn lại được nạp vào cổng nạp của chip bằng đầu côn Rainin® SR-L200F mới. Phần dịch lỏng được thay thế được hút ra từ cổng còn lại và chip được ly tâm một lần nữa trong 4 phút. Sau khi kết thúc quá trình

ly tâm, ấn nút “Next” trên bộ lọc PGM và chip được đặt trở lại vào máy Ion Torrent PGM™ và quá trình giải trình tự bắt đầu.

Quá trình giải trình tự được thực hiện bằng phần mềm DNASTar SeqmanNexGen® (DNASTAR, Inc., 3801 Regent Street, Madison, WI 53705; www.dnastar.com) sử dụng kiểu tùy chọn lắp ráp *de novo*. Quá trình lắp ráp trình tự đã xác định được bảy đoạn trình tự liên tục (contigs) với hơn 10.000 đoạn trình tự nhỏ (read) trùng lặp với nhau của chúng. Các đoạn trình tự liên tục này được phân cắt sao cho chúng thể hiện các khung đọc mở hoàn chỉnh. Các trình tự đã được phân cắt và các trình tự protein tương ứng theo sáng chế bao gồm các trình tự SEQ ID NO. 4 – SEQ ID NO. 17. Phân tích BLASTP các khung đọc mở đã dịch mã đã thể hiện độ tương đồng với bảy đoạn gen của các virus cúm C ở người đã được phân lập và thể phân lập này được đặt tên là virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011. Độ tương đồng gần nhất đối với mỗi đoạn được thể hiện dưới đây. Đoạn gen được ghi chú là mã hóa cho các protein không cấu trúc (NS), được phiên mã thành ARN_{nt} và ghép cặp theo cách khác để thu được hai protein khác nhau (NS1 và NS2) như được thể hiện trong Bảng 7. Độ tương đồng tương đối là tỷ lệ phần trăm tương đồng giữa virus cúm C phân lập được và độ tương đồng gần nhất đối với mỗi đoạn trên các cơ sở dữ liệu đã công bố. Mặc dù PB1 có độ tương đồng vừa phải bằng 85% so với PB1 của virus cúm C ở người được phân lập C/Johannesburg/1/66, nhưng toàn bộ các đoạn gen còn lại đều có độ tương đồng thấp với các virus cúm C có trình tự gen đã biết, và các đoạn gen này có độ tương đồng nằm trong khoảng từ 48% đến 71%. Độ tương đồng thấp của virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 so với các virus có trình tự gen đã biết cho thấy sự khác biệt của virus này.

Bảng 7: Kết quả giải trình tự (phân tích BLAST)

Độ tương đồng

	ORF (axit amin)	Phân tích BLASTP
PB2	762	polymeraza 2 [Virus cúm C (C/Ann Arbor/1/50)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 397/762 (52%), Độ tương đồng tương đối = 538/762 (71%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 2/762 (0%)
PB1	720	polymeraza cấu trúc dưới phân tử PB1 [Virus cúm C (C/Johannesburg/1/66)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 512/708 (72%), Độ tương đồng tương đối = 601/708 (85%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 2/708 (0%)
P3	710	polymeraza 3 [Virus cúm C (C/Ann Arbor/1/50)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 358/722 (50%), Độ tương đồng tương đối = 479/722 (66%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 27/722 (4%)

HE	636	hemagglutinin-esteraza [Virus cúm C (C/Catalonia/1318/2009)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 306/608 (50%), Độ tương đồng tương đối = 399/608 (66%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 19/608 (3%)
NP	552	nucleoprotein [Virus cúm C (C/Ann Arbor/1/50)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 199/504 (39%), Độ tương đồng tương đối = 297/504 (59%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 14/504 (3%)
M	397	sản phẩm chưa ghép cặp của gen M [Virus cúm C (Chủng C/TAYLOR/1233/47)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 145/383 (38%), Độ tương đồng tương đối = 221/383 (58%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 12/383 (3%)
NS1	243	protein không cấu trúc 1 (NS1) [Virus cúm C (C/Hiroshima/248/2000)]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 76/228 (33%), Độ tương đồng tương đối = 110/228 (48%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 21/228 (9%)
NS2	168	protein không cấu trúc 2 (NS2) [Virus cúm C]
		Độ tương đồng tuyệt đối = 53/180 (29%), Độ tương đồng tương đối = 87/180 (48%), Đoạn trống không có trình tự để so sánh = 15/180 (8%)

Nghiên cứu huyết thanh học để xác định tỷ lệ lây nhiễm

Sau khi phân lập được virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 có độ tương đồng trình tự thấp với virus cúm C ở người, các nghiên cứu huyết thanh học được thực hiện để xác định tỷ lệ lây nhiễm cho cả người lẫn lợn của virus này. Khoảng 200 mẫu huyết thanh ngẫu nhiên của lợn được chuyển đến Newport Laboratories từ nhiều bang khác nhau của Hoa Kỳ được phân tích về các kháng thể kháng virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu. Kết quả thử nghiệm này cho thấy có khoảng 8% mẫu huyết thanh dương tính với hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu nằm trong khoảng từ 10 đến 160. Tương tự, các cộng sự tại St Jude's Children's Hospital ở Memphis, TN, đã thực hiện thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu trên ngân hàng huyết thanh của người lớn tuổi (có độ tuổi nằm trong khoảng từ 65 đến 95) ở Canada. Kết quả thử nghiệm này cho thấy có khoảng 28% mẫu huyết thanh dương tính với hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu nằm trong khoảng từ 10 đến 80. Kết quả của các thử nghiệm này cho thấy cả người lẫn lợn dễ bị lây nhiễm với virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 theo sáng chế. Các kết quả thử nghiệm cũng cho thấy rằng virus này có khả năng lây nhiễm cho cả người lẫn lợn.

Thử nghiệm chủng ngừa và thử nghiệm miễn dịch cho lợn

Virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 được nuôi cấy đến mật độ cao (HA = 2560) và bất hoạt bằng etylenimin hai chức, sau đó Trigen 10% (chất bổ trợ dạng dầu trong nước) được bổ sung vào để tạo ra vắc xin virus đã bất hoạt tính. 22 lợn có huyết thanh âm tính với kháng thể kháng virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 được chủng ngừa vào các ngày 0 và 14 bằng 2mL vắc xin virus đã bất hoạt tính này theo đường tiêm bắp. Các mẫu huyết thanh được lấy vào các ngày 0, 14 và 28 để định lượng hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu.

cầu. 28 lợn không được chủng ngừa được sử dụng làm mẫu đối chứng. Các lợn được chủng ngừa đã có sự biến đổi huyết thanh ở ngày 28 với hiệu giá ức chế ngưng kết hồng cầu trung bình = 433. Các lợn không được chủng ngừa cho kết quả âm tính trong thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu. Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 8 và Fig.3. Các lợn được chủng ngừa đã có sự biến đổi huyết thanh mạnh. Quy tắc kinh nghiệm đối với virus cúm A có nồng độ $HI > 40$ sẽ được bảo vệ. Các kháng thể định lượng được trong huyết thanh của các lợn đã chủng ngừa trước khi thử nghiệm miễn dịch cho thấy kháng thể bảo vệ đã xuất hiện trong huyết thanh. Dữ liệu này là phù hợp với kết quả của thử nghiệm miễn dịch.

Bảng 8: Hiệu giá HI ở lợn được chủng ngừa và lợn không được chủng ngừa

Lợn được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch trực tiếp				Lợn được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc				Lợn không được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc				Lợn không được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc				Đối chứng			
Mã số lợn	Ngày 14	Ngày 28 (Ngày 0)	Ngày 42 (Ngày 14)	Mã số lợn	Ngày 14	Ngày 28 (Ngày 0)	Ngày 42 (Ngày 14)	Mã số lợn	Ngày 14	Ngày 28 (Ngày 0)	Ngày 42 (Ngày 14)	Mã số lợn	Ngày 14	Ngày 28 (Ngày 0)	Ngày 42 (Ngày 14)	Mã số lợn	Ngày 14	Ngày 28 (Ngày 0)	Ngày 42 (Ngày 14)
850	40	320		856	20	320		865	0	0		854	0	0		851	0	0	
852	20	160		858	40	640		866	0	0		857	0	0		853	0	0	
860	10	320		861	0	20		870	0	0		859	0	0		855	0	0	
863	10	640		864	80	1280		873	0	0		867	0	0		862	0	0	0
868	10	80		872	20	40		874	0	0		869	0	0		891	0	0	0
876	0	160		875	40	320		878	0	0		871	0	0		896	0	0	0
880	20	20	640	881	20	1280	320	883	0	0	20	877	0	0	40				
886	80	320	640	882	80	1280	640	884	0	0	20	879	0	0	40				
888	10	640	640	887	10	80	80	889	0	0	40	885	0	0	0				
898	80	80	160	890	20	160	160	895	0	0	40	892	0	0	0				
899	20	320	320	893	20	640	640	897	0	0	40	894	0	0	0				
Trung bình	27	278	480		32	551	368		0	0	32		0	0	16		0	0	0

Vào ngày 28, 11 lợn được chủng ngừa và 11 lợn không được chủng ngừa được thử nghiệm miễn dịch theo đường mũi bằng 2mL chứa 6,2 log₁₀ TCID₅₀/mL virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011. Sau 2 ngày thử nghiệm miễn dịch, 11 lợn được chủng ngừa và 11 lợn không được chủng ngừa được nhốt vào chuồng để gây thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc cho các nhóm lợn còn lại. Nhiệt độ cơ thể lợn được đo mỗi ngày từ ngày thử nghiệm miễn dịch đến ngày thứ 14 sau thử thách. Kết quả được thể hiện trên Bảng 9.

Bảng 9. Nhiệt độ cơ thể lợn sau khi thử nghiệm miễn dịch

Lợn được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch trực tiếp						Lợn được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc					
Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8
850	102,5	102,1	103,4	103,6		856	104,5	102,1	104,1	104,4	
852	104,3	105	106,2	104,6		858	102,9	103,3	103,6	103,1	
860	103,5	103,3	102,7	102,4		861	102,9	101,8	104,2	102,7	
863	101,2	102,5	103	102,7		864	103,1	100	103,6	102,6	
868	103,1	103,9	102,2	103,6		872	102,6	103,4	103,5	102,8	
876	105,7	104,5	103,2	102,8		875	102,5	102,9	103,4	103,2	
880	103	105,2	104,7	103,6	104,7	881	103,4	103	104,7	104,3	104,1
886	103,8	103,9	104,7	104,1	103,8	882	102,8	102,9	103,2	102,7	102,7
888	103,7	103,7	104,1	103	103,6	887	102	102,8	102,7	103,4	103
898	101,9	103,1	104,4	103	103,3	890	103,9	102,2	103,8	103,2	104,4
899	103,6	103,8	103,8	101,9	102,6	893	104,6	102,7	103,6	103,7	103,6
Trung bình	103,3	103,7	103,9	103,2	103,6		103,2	102,5	103,7	103,3	103,6
Lợn không được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch trực tiếp						Lợn không được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc					
Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8
865	105,1	104,6	105,2	102,7		854	104,7	103,7	104,2	102,9	
866	103,4	102,7	104,4	102,1		857	103,6	103,6	103,9	103	
870	104,5	103,9	104	103		859	102,3	103	104,3	101,9	
873	103,6	102,9	105,1	102,1		867	104,2	102,8	103	102,4	
874	104,6	103,8	105,6	101,8		869	104,7	103,1	104,3	102,9	
878	102,1	102,6	102,4	103,5		871	103,3	103,3	103,6	102,3	
883	103,9	104,2	104,7	104,4	104,4	877	104,2	104,1	104,8	103,2	103,3
884	102,5	105,3	105	101,4	103,8	879	103,3	102,9	100,9	100,9	103,9
889	103,7	104,2	104,3	103	103,1	885	102,2	103,4	105,1	103,7	103,3
895	103,5	104,3	102,6	101,8	102,8	892	104	103,9	103,8	102,8	103,6
897	103,1	104,8	105	102,4	103	894	103,8	101,6	104,1	103,1	102,3
Trung bình	103,6	103,9	104,4	102,6	103,4		103,7	103,2	103,8	102,6	103,3
Đối chứng											
Mã số lợn	Ngày	Ngày	Ngày	Ngày	Ngày						

	0	2	3	6	8						
851	103,9	104	103,3	102,6							
853	103,1	102,8	102,6	102,7							
855	103,1	103,1	103,1	103,1							
862	103,7	102,8	102,7	101,8	102,3						
891	103,6	104,3	102,7	103,1	103,1						
896	104	103,3	103,3	102,8	103,3						
Trung bình	103,6	103,4	103,0	102,7	102,9						

Quan sát thấy không có sự khác biệt giữa các nhóm điều trị, chứng tỏ rằng virus theo sáng chế không gây sốt với liều lượng virus cúm thông thường. Tương tự, nước mũi được lấy mỗi ngày từ ngày thử nghiệm miễn dịch đến ngày thứ 14 sau thử thách.

Phương pháp phát hiện sự có mặt của virus theo sáng chế

ARN được chiết xuất từ nước mũi và sự có mặt của virus cúm C được xác định bằng phương pháp PCR thời gian thực phiên mã ngược (rt-RT-PCR) sử dụng các đoạn môi và mẫu dò được thiết kế dựa trên trình tự bộ gen của virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011. Trình tự nucleotit của các đoạn môi và mẫu dò theo sáng chế bao gồm các trình tự từ SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.3, trong đó đoạn môi xuôi = 5'-GCT GTT TGC AAG TTG ATG GG-3' (SEQ ID NO.1); đoạn môi ngược = 5'-TGA AAG CAG GTA ACT CCA AGG-3' (SEQ ID NO.2); và mẫu dò = Cy5-được đánh dấu-5'-TTC AGG CAA GCA CCC GTA GGA TT-3'- (SEQ ID NO.3)-IABkQ

Kết quả được thể hiện trong Bảng 10 và Fig.3. “Ct” là viết tắt của ngưỡng chu kỳ. Trong phương pháp PCR thời gian thực, vật liệu di truyền (ARN hoặc ADN) được sao chép bằng polymeraza sau khi lặp lại các chu kỳ mẫu/enzym ở các nhiệt độ khác nhau. Phương pháp PCR thời gian thực sử dụng chất phát huỳnh quang liên kết với sản phẩm ADN được tạo ra. Khi chu kỳ PCR tăng và sản phẩm ADN càng được khuếch đại, thì tín hiệu huỳnh quang càng được tạo ra mạnh hơn. Ở một số thời điểm, tín hiệu huỳnh quang được phát hiện bằng thiết bị PCR. Giới hạn phát hiện tín hiệu huỳnh quang được gọi là ngưỡng phát hiện. Số lượng chu kỳ PCR cần có để tạo ra tín hiệu huỳnh quang mạnh hơn ngưỡng phát hiện này được gọi là trị số Ct. PCR thời gian thực có thể định lượng hàm lượng ARN/ADN trong mẫu ban đầu sao cho khi càng có nhiều ADN/ARN trong mẫu trước khi PCR, thì càng cần ít chu trình/nhân bội để tạo ra tín hiệu huỳnh quang mạnh hơn ngưỡng phát hiện. Do đó, trị số Ct càng nhỏ thì càng có nhiều ADN/ARN trong mẫu ban đầu.

Bảng 10: Trị số Ct định lượng phiên mã ngược đối với virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 có trong nước mũi lợn.

Lợn được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch trực tiếp							Lợn được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc						
Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10	Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10
850	37,1	37,1	37,1	37,1			856	37,1	37,1	37,1	37,1		
852	37,1	37,1	37,1	37,1			858	37,1	37,1	37,1	37,1		
860	37,1	37,1	37,1	37,1			861	37,1	37,1	37,1	37,1		
863	37,1	37,1	37,1	37,1			864	37,1	37,1	37,1	37,1		
868	37,1	37,1	37,1	37,1			872	37,1	37,1	37,1	37,1		
876	37,1	37,1	37,1	37,1			875	37,1	37,1	37,1	37,1		
880	37,1	37,1	37,1	37,1	33,6	37,1	881	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1
886	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	882	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1
888	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	887	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1
898	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	890	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1
899	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	893	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1
Trung bình	37,1	37,1	37,1	37,1	36,4	37,1		37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1
Lợn không được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch trực tiếp							Lợn không được chủng ngừa, thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc						
Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10	Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10
865	37,1	37,1	34,53	37,1			854	37,1	37,1	37,1	37,1		
866	37,1	37,1	37,1	37,1			857	37,1	37,1	37,1	37,1		
870	37,1	37,1	37,1	37,1			859	37,1	37,1	37,1	37,1		
873	37,1	37,1	37,1	37,1			867	37,1	37,1	37,1	37,1		
874	37,1	37,1	35,2	28,6			869	37,1	37,1	37,1	37,1		
878	37,1	37,1	37,1	31,32			871	37,1	37,1	37,1	37,1		
883	37,1	37,1	35,05	34,85	34,23	37,1	877	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	34,98
884	37,1	37,1	37,1	29,65	24,21	29,45	879	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	40,52
889	37,1	37,1	34,69	35,54	35,85	29,37	885	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	32,49
895	37,1	37,1	35,5	30,26	29	37,1	892	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	27,35
897	37,1	37,1	32,8	29,76	28,11	37,1	894	37,1	37,1	37,1	37,1	36,53	37,1
Trung bình	37,1	37,1	35,8	33,5	30,3	34,0		37,1	37,1	37,1	37,1	37,0	34,5
Đối chứng													
Mã số lợn	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 8	Ngày 10							
851	37,1	37,1	37,1	37,1									
853	37,1	37,1	37,1	37,1									
855	37,1	37,1	37,1	37,1									
862	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1							
891	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1							
896	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1							
Trung bình	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1	37,1							

Trị số Ct trong Bảng 10 thể hiện hàm lượng ARN virus trong nước mũi. Trị số Ct = 37,1 tức là kết quả âm tính. Trị số Ct bất kỳ nhỏ hơn 37,1 là dương tính với ARN virus (do đó có chứa virus). Dữ liệu này cũng được thể hiện trên Fig.3. Nhóm lợn không được chủng ngừa, có thử nghiệm miễn dịch có hàm lượng ARN virus rất khác biệt so với các nhóm lợn được chủng ngừa. Phép kiểm định Student được sử dụng để phân tích dữ liệu và nhóm lợn không được chủng ngừa được thử nghiệm miễn dịch trực tiếp có số lượng virus cao hơn so với các nhóm còn lại ($p < 0,001$). Do đó, vắc xin này đã bảo vệ được cho các lợn. Virus chỉ phát hiện được ở một lợn được chủng ngừa sau khi thử nghiệm miễn dịch trực tiếp hoặc thử nghiệm miễn dịch qua tiếp xúc. Trái lại, các lợn không được chủng ngừa đã dương tính với virus sau 3 ngày thử nghiệm miễn dịch (thử nghiệm miễn dịch trực tiếp) hoặc sau 6 ngày tiếp xúc (thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc). Thử nghiệm này chứng tỏ rằng virus theo sáng chế có thể lây nhiễm và tái bản ở lợn và do đó có thể lây nhiễm cho môi trường và các động vật tiếp xúc. Ngoài ra, các lợn được chủng ngừa bằng vắc xin tương đồng được bảo vệ hoàn toàn khỏi bị lây nhiễm.

Thử nghiệm miễn dịch ở chồn sương

Chồn sương thường được sử dụng thay cho người trong nghiên cứu về virus cúm do các virus cúm ở người thường dễ tái bản ở chồn sương. Do virus cúm C là tác nhân gây bệnh thông thường ở người, nên virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 được sử dụng để thử nghiệm miễn dịch cho chồn sương để xác định xem liệu virus này có là tác nhân gây bệnh cho người hay không. Ba chồn sương được thử nghiệm miễn dịch theo đường mũi bằng virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 với liều lượng bằng $6,0 \log_{10}$ (liều lây nhiễm 50% tế bào/mL) (Tissue culture infectious dose 50 - TCID₅₀/mL). Sau một ngày thử nghiệm miễn dịch, ba chồn sương này được nhốt vào chuồng để gây thử nghiệm miễn dịch cho các chồn qua đường tiếp xúc. Ngoài ra, 3 chồn được nhốt trong chuồng riêng để gây thử nghiệm miễn dịch qua đường hít. Các kết quả thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 11 và Fig.4.

Bảng 11: Nồng độ TCID₅₀/mL của virus được phát hiện trong nước mũi của chồn sương bị lây nhiễm virus C/lợn/Oklahoma/1334/2011 bằng cách chủng ngừa trực tiếp, tiếp xúc trực tiếp hoặc tiếp xúc qua đường hít.

Mã số chồn sương		Ngày sau chủng ngừa (TCID ₅₀ /mL)				
		0	3	5	7	10
55	thử nghiệm miễn dịch trực tiếp		3,3	2,3	0,0	0,0
56	thử nghiệm miễn dịch trực tiếp		3,9	0,0	0,0	0,0
57	thử nghiệm miễn dịch trực tiếp		2,8	0,0	0,0	0,0
Trung bình	thử nghiệm miễn dịch trực tiếp	0,0	3,3	0,8	0,0	0,0
58	tiếp xúc trực tiếp		0,0	0,0	2,0	4,5
60	tiếp xúc trực tiếp		0,0	0,0	0,0	4,2
61	tiếp xúc trực tiếp		0,0	0,0	2,2	4,1
Trung bình	tiếp xúc trực tiếp	0,0	0,0	0,0	1,4	4,3
62	tiếp xúc qua đường hít		0,0	0,0	0,0	0,0
63	tiếp xúc qua đường hít		0,0	0,0	0,0	0,0
65	tiếp xúc qua đường hít		0,0	0,0	0,0	0,0
Trung bình	tiếp xúc qua đường hít		0,0	0,0	0,0	0,0

Virut được phát hiện trong nước mũi bằng cách định lượng các tế bào tinh hoàn ST. Virut được phát hiện sau 3 ngày thử nghiệm miễn dịch ở chồn sương được thử nghiệm miễn dịch theo đường mũi và sau 6 ngày tiếp xúc ở chồn sương được thử nghiệm miễn dịch qua đường tiếp xúc. Không phát hiện thấy virut ở chồn sương tiếp xúc qua đường hít. Dữ liệu này chứng tỏ rằng virut C/lợn/Oklahoma/1334/2011 có khả năng lây nhiễm cho chồn sương được tiếp xúc bằng thử nghiệm miễn dịch trực tiếp hoặc tiếp xúc với chồn đã được thử nghiệm miễn dịch. Tuy nhiên, virut này không lan truyền theo đường hít. Điều này cho thấy rằng virut C/lợn/Oklahoma/1334/2011 có khả năng lây nhiễm cho người.

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học sử dụng trong sáng chế có nghĩa tương tự được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong sáng chế có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, nhưng các phương pháp và vật liệu thích hợp được mô tả dưới đây. Toàn bộ nội dung của tất cả các đơn công bố, đơn Patent, Patent và các tài liệu tham khảo khác được kết hợp vào sáng chế bằng cách viện dẫn theo quy định của pháp luật hiện hành. Khi có sự khác biệt, ưu tiên sử dụng các thuật ngữ theo sáng chế. Sáng chế có thể được thể hiện theo các phương án cụ thể khác mà không thuộc phạm vi của sáng chế, do đó các phương án hiện tại chỉ là nhằm mục đích minh họa chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NEWPORT LABORATORIES, INC.
 <120> VACCIN BẢO VỆ ĐỘNG VẬT CÓ VÚ KHÁNG LẠI SỰ LÂY NHIỄM VIRUT CÚM C
 <130> 31671.20
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virut cúm C
 <400> 1
 gctgtttgca agttgatggg 20
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virut cúm C
 <400> 2
 tgaaagcagg taactccaag g 21
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Virut cúm C
 <400> 3
 ttcaggcaag caccgtagg att 23
 <210> 4
 <211> 2169
 <212> ADN
 <213> Virut cúm C
 <400> 4
 atgagatggg caatgggaag caagttccca attatggcaa acagagaaat tttggaagaa 60
 gctgggatac cagaacaatg ggaagggata gaccttttgg caaaaaagga tgatgtttca 120
 aagttgggga tgggtgttagc gtctccagca gccataactt actggaattt ttgtggacct 180
 ggagtggaca attcttctgt aataaaagat gtttataaag caaaatttat gaaaaaagaa 240
 agatggagag agactctatg gggaccaatg aactttgaat tgggtgggtaa acaaagaaga 300
 gtggttgaaa ctcaaccagt ggaataaag ctaaaccaa aagaaataaa agaactaacg 360
 atgtgggttc tttttgaaga tgaagcaaac ctgtgcaagca aattcataca ggaaaatttc 420
 tcaactgtcc tgcattaaag agaactttac aagggaaagg cagtaaataa agatgttgca 480
 gctttcatga ttgccacca attttctccc gagaagagg tcttaccac ttttggcccc 540
 attagaccag aaagaatgga gctactccac tgtttagggg gtgatttctg gaagatagag 600
 gcagtaactg cagggagcct gaacgaagaa caaaagaaga gagatgttag agcagttgct 660
 agaaaaattt gccttagagc aagtgtggac ttattttact cagcagagaa gataagggac 720
 tatatggcaa gtgtgacaat gagatttggg acagtagaaa gaacattcga agacgtaata 780
 agaaacagtg atgacatatc tgcggaagta accttatgca aggcggcact tgggtgcgaa 840
 ttgggcaaaa gcatgagcct tgggaatcta aatctgagga aagtcagtgg agaagcagaa 900
 acaatggaaa aaacagtata ttggggatta aagcccataa aatataaatg ctggagagga 960
 gaggaacat tttattgtga actgagggaag gtaacttgta tgtttagaag gtctgaaggc 1020
 ctagattggg ctaacattgg acctggttca cctgaagaaa gaagagagct tttggcaatg 1080
 gtgatgatat tctgcagaga tgggagattc tttgaatctg caccagttaa tattgatgaa 1140
 tcattcttta ggacaagact gaataaagaa atacctatc aatatgtgct gctaaaaatg 1200
 gtaaggcaat cgagagacaa ctgggatgcc ttgttgagta caagaggact aatacctgct 1260
 catattggac aattcggaag aggaatggga atagatggaa gtagctcatc ttctatgggt 1320
 tacaagggag tcatgtttgc gaagacacag atagacatag tggagagcaa agagaagcac 1380
 agactgtttt taaatgacaa tatagaagca gtgacagaga gaggagcaat ggttgcatcc 1440
 ataattggacc tatcagagga taatagagaa acatttaacg atgtgacttt taacctgtc 1500
 gacttagctg ttctcaaaga tgaagagact gcaataataa agatatatcg atcactagt 1560
 gaaagaataa aactgatgta tgatggccta cctgcttga taatgggtaa aagatattta 1620
 gagttgtatc aattagatga agtaaaagac gcggtcgggc taataccaaa aaggatgctg 1680
 ggggcgtatt cctaccaagc aagacagctc atacagtcac agatcaaaaa tgacagttat 1740
 agccttctcg aaataataaa gttactgccc ttctgttaca gccctccaaa gaaaatgtta 1800
 tttgatggga ctttccattt caaaaatcaa atgtatgtta ggcctggaat aaacacaaac 1860
 cttttcagtt ttagtaagac cgacaaaagc aagatatatg tgaacggaag cgagtaaaa 1920
 ataaagcttg tgctcgaga cgatgaaatg gacaccagtc ttgcctttgt tgaaggattt 1980
 caagtttgtg aatatgatcc aagagcacct ttgataccaa gaagagattt gagactgatt 2040
 gggttcggaa agaaagttag agtttttgtt ggtcagggac aggagaaaac cctggtgagg 2100
 acgagctcca aaagagccgc ctcccatgat gtaagcaaaa acattcgtag aatgcgtctg 2160
 gaagtttga
 2169
 <210> 5
 <211> 2163
 <212> ADN
 <213> Virut cúm C
 <400> 5
 atgtcacatg gaacatcgac caaatactca atggagactg tgtcaagaac ttactcctac 60
 agtagaacta aaaaagaggt accttcggga atattcccaa tagagagaag gaaattctgt 120
 aacacaatag aagacaaaag aaacctagaa aaaccgaatg gaaatgttga tataaatttc 180
 atgttatcgc tggcagaaat gctggaagaa aagatgggga aagggttctt caaattctgt 240
 gccaatgaag ctgaagctga aattttgaag atgcacttca gcaagctcac tgaaggaagg 300
 caaacttatg actggacaag tgaaagaaat atgccagcag ccaccgctct tcagctaaca 360

gtagacgcta	tacaagaaac	acagggaaac	ttcaaaggaa	ctaccatggt	tgaatattgc	420
aacaagatat	tagaaatgat	ggattggccg	gaagtgaat	tcaaaaaagg	cagaatgatt	480
gttcagaggg	attgggaccc	gaaaacccaa	aaagaaataa	aaatgaagtc	tccaacattg	540
atgataacaa	agatttgaag	agaagaattc	ataaagagga	tatgcacgat	aaataccatg	600
gccaaagacg	gagaagagg	aaaatacaaa	agaagagcta	tagccacccc	cgggatggga	660
atcaggccat	tctcaaaaat	tgtggaaact	ttagcacaaa	agattttgtga	gagactagca	720
gagagcggtt	tgctgtttg	gggaaatgag	aagaaagcca	aactaaaaac	tacggctctc	780
tcaacaaact	caaaactcat	agaagggcaa	ttcatgttaa	acataacagg	ggacaacagc	840
aagtggaaat	aatgtcagca	accagaagct	tatcttgcaa	tgttggcata	cattactaaa	900
gacagcagca	acttaatgaa	agatctctgc	tcagtagcac	caacattggt	ctgcaataag	960
tacgtaaaaa	tgggacaagg	tttccgagca	aaaaacaaaa	gaaaaaccaa	agaaatagtg	1020
ataccgcgaa	aaaaatgaa	agaagggaag	gaattgatga	acgcgggaat	gagggaccta	1080
tttgaacaaa	tagaacctta	catggatgga	gagtgtgtct	tcttgggggg	aggaatgctg	1140
atgggaatgt	ttaacatggt	gtcaactggt	tttggagtc	tgacattcat	gacattaagc	1200
attacagagg	aactgkaws	aytggccaga	aggaactggt	actggactgg	gctacaaagt	1260
tcagatgatt	ttgtgtctct	ttgcatctct	aggacttggc	cagagatgga	gatgactatt	1320
ctaaaattca	tcgtgtttt	caagttgatg	ggaataaaca	tgtcttttga	aaaatcctac	1380
gggtgcttgc	ctgaaacttt	tgagttcaca	agcatgttct	tttccgggga	ttttgtctca	1440
aacatagcct	tggaattacc	tgctttcaca	acagctggaa	tgaatgaagg	aaccgacttc	1500
acagctgcga	tgtctgtcat	aagaacaaac	atgattaata	atggactttc	tcctgggact	1560
gctttaatgg	ccctgcgaat	ttgtctgcag	gaatttagag	caacatacag	agtacaccct	1620
tatgattctg	gagtgaagaa	tcacgcgaat	aaaatcataa	ggaattcat	tgaaactatt	1680
gaaaaacaa	atggattgct	gatatcagat	ggcgggaaat	taatgaacaa	tatctcaagt	1740
ttgcacatcc	ctgaagaaat	attgaaagag	gatttgatgg	atccctccta	caggaacaga	1800
gttttcaatc	ctaggaaccc	ctttacacag	tttgagaaga	cagttgacat	ctttaaggc	1860
agtggaccta	taagggtaga	ggagaacgag	gcagttgtat	caacgcattc	ctttagaaca	1920
aggagcaata	ggacattgct	aaatacagac	atgagggcaa	tggtctctga	agagaaaaga	1980
taccagtttg	tttgcaactg	gtaccgatcg	gtcttcgaaa	gtgcagacgt	taacacccca	2040
ataggatcaa	tgtcgtatgg	agaggcaatt	gaagccaaaa	tccttgaccg	ggccagaacc	2100
cagtttgaat	atggaatcat	agggggagaa	gaatwttctg	wwatyaacr	acgcaaagct	2160
taa						2163
<210>	6					
<211>	2133					
<212>	ADN					
<213>	Virut cúm C					
<400>	6					
atgtctagt	taatcagaga	aatcgcaaa	cgattcttgg	aacaagcaac	gataaacatc	60
gctgaagaag	tggtcagaga	atatggagac	catgaaagaa	caatgatatc	tgttggagtt	120
catttccaag	cttgcctgct	tataagtgat	gaatataccc	ttgaggatga	gacaacccca	180
agatacgttc	ttttggaggg	attgaaaaga	caagagggcta	taagcaagca	gaataacatt	240
tgctccactt	tggtgattga	gcccttgaga	aatctagcag	atatttttga	tcgaaaaaca	300
agaagattcc	ttgaggtagg	aattacaaag	agagaatccg	atgagtatta	ccaggaaaag	360
ttcaacaaaa	taggaaatga	catggacata	catgttttca	catatgaagg	caaataattc	420
agcaacaatc	ccaatggggt	ggaagacatc	caaaagacaa	gaatttttca	attcctatct	480
tttgtgtcag	acgaatttag	aaaagagaac	atgttcacag	aaatgtatgt	tacagaagaa	540
ggggcacctg	aacttgaaat	gtacaagtca	aagcttttca	ttgcgatgag	agacgagagc	600
gtgcctttgc	cttacataaa	ctatgagcac	cttaggacaa	gatgtgaaac	attcaaaaga	660
aatcaggctg	aatgcgaagc	aaaggtagcg	gatgtggctt	cacggctaaa	aatcaaaactg	720
gaacatctag	aagaataata	actgcggccg	ctagagatag	cgaaggagaa	agaggctccc	780
tatacacaca	aatttttgat	gaaagatgct	tggttctttg	caaaacctca	tgattcggag	840
agagcacaa	cgcaacagat	attgtatgat	ttctttgaag	cagcaaacat	ggggttcattg	900
acgacatccc	caaaacccat	attcggaaag	caaggactga	tgtatcactc	cctctggggg	960
cagacaaaaa	gagcaataaa	ggacaagaga	aatgagttgg	agccttcaga	acagagagac	1020
ttccttttgt	gaattggaag	agcctccaag	aaaatacagg	aggacaaatg	gcaagaatcc	1080
agagaggaag	agtttaaaaca	agaagagact	aaaggggcag	ctaagagggg	gttcccaaca	1140
tggtttaaat	aagaatggct	ttgggcaatg	agggactcag	gggatgggga	caataaaaata	1200
ggggatttga	taccatggc	agaaatgcct	ccctgcaaga	atgagatgga	agattatgca	1260
aaaaagatgt	gtgaagaatt	agaatccaaa	atacagggaa	caaatttgtc	tagggaaatg	1320
tccaagtgtg	tacatacaat	tggtgagctta	catacagaat	gtaggaaact	tcccggaaaag	1380
gtcaagatag	tgccatatata	gtcagaggg	acactgagag	gggaatcaac	tgactgtttg	1440
tttgaatatg	caataaaaag	gaaatcccat	ttaaacaaa	atgatggaat	gtatactgtt	1500
gtaacttttg	agttttccac	tgaagaacca	aatccaagca	aacatgaaaa	atatacggtc	1560
ttcgaagctg	gaacagtgcc	tgtggaagcc	gtggtgttaa	ctcccaaaa	ggaaaagagtt	1620
ctcaaagaga	agaaattggt	cctttattgc	agaactactg	gaatgagcaa	gttaaagaac	1680
gattggtttt	ctaaatgcag	gagatgtcct	ataccaacaa	tgagagactgt	agagcagata	1740
gtgctgaaag	aatgcgctct	gaaagaagaa	aacagagttt	cagagatggt	ggagaataag	1800
agagcttgga	ttgcccatga	gaacggagag	aatcttataa	gatttggtatc	aacaaagctc	1860
aaggacttgt	gtagaatgct	aattgtgaca	caattttatt	actgtatata	taacgacaat	1920
caattggaag	gattctgtaa	cgagcaaaa	aaattcctta	tgttttcttca	agcagataag	1980
gactcaaaat	ctgcattttac	ttttaatcag	aaaggggtat	atgaaaaaat	tgaagagtggt	2040
attgtcagca	atccattatg	tattttccta	gctgataggc	taaacaaaat	atttcttgta	2100
gccaagtcca	atggagctaa	gtactttgaa	tga			2133
<210>	7					
<211>	1911					
<212>	ADN					
<213>	Virut cúm C					
<400>	7					
atgtttttgc	ttctagcaac	aattacagca	ataactgctt	gccaagcaga	aagagaactg	60
atatgcatag	tgcaagagat	gaatgaaagc	ttctctcttc	actctggatt	tgaggagaaat	120

```

gtttacagca tgaagactga gccaatgact ggattcacaa acgtgaccaa aggtgctagt 180
gtcatcaacc aaaaagactg gattggattc ggagattcaa gaacagactt gactaatgat 240
cagtttccag cgtcttcaga tgttccattg gcagtgccga agaagtttcg gtcattgtca 300
ggggcttctg tgaattgttc agcttttggc cctcctggca aggttgacta cctctatcaa 360
ggatgtggga aagaaaaagt attttatgaa ggggtaaact ggtccctga ggcaggaatt 420
gattgctttg gatcaaaact gactcagaca aagaaggact tctattcgag gatatatgaa 480
gctgctagaa gcagcacatg catgactctt gtaaatcttc ttgacaccaa gatatcatca 540
acaacagcca cggctgtgac gcactcttct tgttcttcaa gttggatgaa aagcccggtt 600
tggtatgcag aatcttctgt taatcctgga gctaaacctc aagtttgtgg gactgagcaa 660
tcggcaactt ttactttgcc gacaagcttc ggaatttaca aatgcaacaa gcatgtagt 720
cagctttgtt actttgtgta cgaaaacaaa gcaaaattta acacttttgg ctgtggagat 780
tattaccaa attactatga tgggaatgga aacctgtag ggggaatgga taacagagt 840
gcagcatata gaggaatagc aaacgctgga gttaaaattg aatgtccttc caaaatcttg 900
aacctggga cttacagcat taatcaaca ccaagattcc ttctagtacc aaaaaggta 960
tactgtctcg aactgtatg agggatccct atacaagtag ttcaatctga gtrgtcakct 1020
tsacgawgrt cagmtwcayg magatcagat aatgccacag aagaagcatg cctacaacaa 1080
gaaggatgta ttttcatcaa aaagacaacc cttatgtag gagaagcaga tgacaacct 1140
ggagacattg agatgaggca actcttgagt gggcttgga acaacgacac agtgtgcgtt 1200
tcccaaagt gatacaaaa aggagagacc ccttttgtaa aggattatct gagtcctccc 1260
aagtatggca agtgttgga gaaaactgac agtggaagaa tcccaactct acctctggg 1320
ttgataatc cgcaagcagg gactgactct ttaatgagaa ctttgacgcc agcaacaagg 1380
atcttcgga tagatgactt aatcttcggg cttttattcg tggggtttgt cgaggagg 1440
gtcgcaggag gttaactctg ggaagatca aatggagggg gtgggtgtgc ctcgtgagc 1500
agtacgcagg ctggatttga caaatcggga aaagatatc agcagcttcg gaatgacaca 1560
aatgcgcaa ttgaaggctt caacgggaga attgccatg atgagcaags cattaagart 1620
ttggcaaaag aawtogaara wgcaagsma gakgcwkwg yagaggcttt ggtaggggaa 1680
cttggtataa taagatccct catagttgcc aacataagca tgaatctaaa agaacttta 1740
tatgaactga caacccaaga acaaaaaaga ggaggaggaa ttgcacaaga agsaggccma 1800
kkyrywrga wgcagrccca ggtgttggg atgttgactc cgaaaactgt gatgcaagct 1860
gcaaagagta cattttcaac ttcaatggaa gtgccactgt cccacattg a 1911
<210> 8
<211> 1659
<212> ADN
<213> Virut cúm C
<400> 8
atggactcaa caaaagccca aacgcctgaa gagcagagag caaagaatgc caaaaccatc 60
cttgagaaca tacagatata tgaaggatg tgtgatctct ttggggtgtc agaagatgac 120
aaactgataa ttgagaacag tatttcaatt gagaggatga taagagtgtg aacagataag 180
aaataccaag acaaaaaact aaagaatgct ggaagtgtac ctgaaaagat tgcaaatgca 240
gggaaagtgt tctgtcgatt ggtggagtca acagctggga aatgtagtgc aagattggga 300
atggcactga aaccacagct tgaggcagtc ctgaccgatg tactcgggaa tgaactggat 360
agggtgctg tgcttgggaa aagaatgggg ttttcagcaa tgttcaaate aaacctggaa 420
gaggttttgt accaaagagg aaagaatcag cttaaaaaga ggaatgctgc agaaactttc 480
actctttcac aaggtgcttc gctagaggca agatttaggc ccataatgga aaaacaccta 540
gggtttggga ctgttggggc gtcaataaag aatatcctgg caagcaaaaa gaacgggaac 600
tacaggaaca agatgggtgag gaaacctgga ggaaacagag agagctggtc accattggag 660
agagagatat cctttctgaa caagaagtgt ttctctggac caatgaggca gctctgcaag 720
aaattcgaat acttgaacga gcaagagaag caactggcct taaaccttat gctggatgca 780
agtctcatcc taaaaccgca agtgactcac aaaaatgataa tgccttgggtc aatgtggctg 840
gctgtgaaga agtatgcaga aatgaacaag ggatcaccca gtcttgaaga cctcgcagcc 900
tattctggag taagagcctt tatggccttc aatacagctt gctacatgag taaatcacc 960
attgggaagg gaattgtggg agatgcagag atcatggaaa atggaaacga caagatgcaa 1020
actcttgcaa tggcttgggt ttgactggcg tatgaagaca ccgggattgt tgtgcaatg 1080
atctcccaac ccatgaagaa aagatatcag ttgagagtgg ggaacttcaa tcctccagaa 1140
aaaggaacaa taaaaggaa aagcgccggc tatttcacaa agtgggctga atttgaaat 1200
aggctgcctt tcaacagttt tggaaactgg gaatccaaac agataagcaa ctcaggagt 1260
tttgcatgac agagggccag cactactaac attcaaaagc tggcagagct aatggctagg 1320
aataccggag aaaccagcga caactttact cagttgtgtc agaaaataag agaacaagt 1380
ggggcctttg ctgatcaaaa agcaaatctt cgagagtcca ccggaggata tatttatgac 1440
attactgacg taacgaagag caaccccaag atacctcagt tgggtgggga ctctttcttc 1500
tttgatttca ccggaagcga cgttccaaga actggagcca aaagaagagt gggaggagct 1560
gatgatgtga cccttggaa ttcccagccc aagaaaaagg gaaggcaagg tgccggagca 1620
gwakcaagta tggacattga aacagtgtgt gaagattaa 1659
<210> 9
<211> 1194
<212> ADN
<213> Virut cúm C
<400> 9
atggcacaag aacaactact tgctgaactt gagggatacc tcagaggagt taaccaatg 60
accaggcaaa cgattatgaa gtctgcaaga ggtgggatgg atagtgttaa ggaggcagca 120
aaagcagcga agaagggaga aatgcaacta acaagtggag agagcatagt ggtgcacata 180
tgcttgagag ccatgtaccc tggaaataaag ccatggtcag aagccaaaaa agatcttgat 240
aaagctacag aaggactgag tggaaaagac tgcaaaaata taagaaaagc tctgaggaag 300
gcaggagacc tgacagggat aaaggagatg atgatgatgt atgaaatgag ggaggacaaa 360
aaagcagaaa tggtagagca aatctacgat gaccagagg attttacaga agatgtaagg 420
cttgggaccg ttgctgcctg gcttcaatgc aaaaacaaa ggagcgagaa atatcatcac 480
aagatgtcaa tgtctggaag cactgcactt gccttgggag atgccccaaa ggcgggaatg 540
gccatgaaaa atatggctag tgttgtgcca atgaaaaaag aggccaggc actgcacaaa 600
gacgcagaag ttttgattga actggcaaga atagcatatg ggtcaagagc aatggaagg 660
cacctgcaaa atgcaatgga cggaaattgga agcaaatgca gtggaatggc taatcttgcc 720

```

```

ctaaaaaggt cagttcttac tttgttaatg ttggtaatgt gtgggatccc cacttggtga 780
aatgtcgaag ctgtggaaga attttgtaga aagaaactaa atcagacgga agaaaaggtt 840
tatgtccatt gtttcaatga ggatgatggt cgggcaatga ctttagctgc tttgatactt 900
ggatgcttta gtatgcttta cattttaata aaggcaatac tgatgctttt gttgacaatc 960
ataaatggaa gaccaaattg aagttgggat gacttgaac atgttgtaaa atgtttttca 1020
gagactggaa gtgagaactt cgccagggat ataatggtcc tggaatccag gcgagatggg 1080
gaggagacaa gctcccccaga ggagggacta ggcctccat tgagtggatt caatgaaatg 1140
gtgtattcat ggaacatta tatccctggc gaagtctctw cttccagtct ctga 1194

```

<210> 10

<211> 732

<212> ADN

<213> Virut cúm C

<400> 10

```

atgtctgaag ataagtcagt gaacacaaca aatatcagag cagcaatctc cgaattggca 60
ttggcgcgag ccagctggat ggattcctct ggtttaatga ctttcgagaa aatgagaaa 120
tctgtcgaga attcactgag agtcgaacag gtttatgaac cgagaacttg ggaagatgca 180
gtggctgaag gttagaagaat tctaggattc actactattg ctgccttaag aaaaccagag 240
gagactcatg ctgtgaatt gggaagaac attatctatc ccttagaggag aaaccctttc 300
tatctaagcc catgtacat tgacactctg tatgagccaa agctcataag acaaggagaa 360
gtctttggag taaaatatcg gaactgcaat tgctttgtaa aaactgctga actattagt 420
accgacatgg gagaaatcat tgtgctcttt tgcagaaaca ctgagaaacc agcttactgc 480
cttaagaatt tccgtagagg agatgaccca gagaagtcag tacgaaagat actcagaatt 540
tggaagaagt gacttggtgt tgccgttgat gcggaatcta gagatgaaat cagacgatac 600
aaatctggat gtgaacaga tcccttctg agaagagaag gcgcaactac tggagaggtt 660
caggagttgc ttggtgcat tgataaggtt gaaatccaag ctgggagtag cgatggtgaa 720
ctctttgact aa 732

```

<210> 11

<211> 762

<212> PRT

<213> Virut cúm C

<400> 11

```

Tyr Ala Asn Leu Thr Lys Asp Lys Lys Ser Cys Lys Leu Leu Ser Gln
1 5 10 15
Gly Thr Val Ser Ser Tyr Thr Thr Phe Lys Lys Trp Thr Thr Ser Arg
20 25 30
Lys Glu Lys Asn Pro Ser Leu Arg Met Arg Trp Ala Met Gly Ser Lys
35 40 45
Phe Pro Ile Met Ala Asn Arg Glu Ile Leu Glu Glu Ala Gly Ile Pro
50 55 60
Glu Gln Trp Glu Gly Ile Asp Leu Trp Ser Lys Lys Asp Asp Val Ser
65 70 75 80
Lys Leu Gly Met Val Leu Ala Ser Pro Ala Ala Ile Thr Tyr Trp Asn
85 90 95
Phe Cys Gly Pro Gly Val Asp Asn Ser Ser Val Ile Lys Asp Val Tyr
100 105 110
Lys Ala Lys Phe Met Lys Lys Glu Arg Trp Arg Glu Thr Leu Trp Gly
115 120 125
Pro Met Asn Phe Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg Arg Val Val Glu Thr
130 135 140
Gln Pro Val Glu Ile Lys Leu Asn Gln Lys Glu Ile Lys Glu Leu Thr
145 150 155 160
Met Trp Val Leu Phe Glu Asp Glu Ala Asn Leu Ala Ser Lys Phe Ile
165 170 175
Gln Glu Asn Phe Ser Leu Val Leu Ser Leu Arg Glu Leu Tyr Lys Gly
180 185 190
Lys Ala Val Asn Lys Asp Val Ala Ala Phe Met Ile Ala His Gln Phe
195 200 205
Ser Pro Glu Lys Arg Phe Leu Pro Thr Phe Gly Pro Ile Arg Pro Glu
210 215 220
Arg Met Glu Leu Leu His Cys Leu Gly Gly Asp Phe Trp Lys Ile Glu
225 230 235 240
Ala Val Thr Ala Gly Ser Leu Asn Glu Glu Gln Lys Lys Arg Asp Val
245 250 255
Arg Ala Val Ala Arg Lys Ile Cys Leu Arg Ala Ser Val Asp Leu Phe
260 265 270
Thr Pro Ala Glu Lys Ile Arg Asp Tyr Ile Ala Ser Val Thr Met Arg
275 280 285
Phe Gly Thr Val Glu Arg Thr Phe Glu Asp Val Ile Arg Asn Ser Asp
290 295 300
Asp Ile Ser Ala Glu Val Thr Leu Cys Lys Ala Ala Leu Gly Cys Glu
305 310 315 320
Leu Gly Lys Ser Met Ser Phe Gly Asn Leu Asn Leu Arg Lys Val Ser
325 330 335
Gly Glu Ala Glu Thr Met Glu Lys Thr Val Tyr Trp Gly Leu Lys Pro
340 345 350
Ile Lys Tyr Lys Cys Trp Arg Gly Glu Glu Thr Phe Tyr Cys Glu Leu
355 360 365
Arg Lys Val Thr Cys Met Phe Arg Arg Ser Glu Gly Leu Asp Trp Ala

```

```

370          375          380
Asn Ile Gly Pro Gly Ser Pro Glu Glu Arg Arg Glu Leu Leu Ala Met
385          390          395          400
Val Met Ile Phe Cys Arg Asp Gly Arg Phe Phe Glu Ser Ala Pro Val
          405          410          415
Asn Ile Asp Glu Ser Phe Phe Arg Thr Arg Leu Asn Lys Glu Ile Pro
          420          425          430
Tyr Gln Tyr Val Leu Leu Lys Trp Val Arg Gln Ser Arg Asp Asn Leu
          435          440          445
Asp Ala Leu Leu Ser Thr Arg Gly Leu Ile Pro Ala His Ile Gly Gln
          450          455          460
Phe Gly Lys Gly Met Gly Ile Asp Gly Ser Ser Ser Ser Met Val
465          470          475          480
Tyr Lys Gly Val Met Leu Ser Lys Thr Pro Ile Asp Ile Val Glu Ser
          485          490          495
Lys Glu Lys His Arg Leu Phe Leu Asn Asp Asn Ile Glu Ala Val Thr
          500          505          510
Glu Arg Gly Ala Met Val Ala Ser Ile Met Asp Leu Ser Glu Asp Asn
          515          520          525
Arg Glu Thr Phe Asn Asp Val Thr Phe Asn His Val Asp Leu Ala Val
          530          535          540
Leu Lys Asp Glu Lys Thr Ala Ile Ile Lys Ile Tyr Arg Ser Leu Val
545          550          555          560
Glu Arg Ile Asn Thr Asp Asp Asp Gly Leu Pro Ala Leu Ile Met Gly
          565          570          575
Lys Arg Tyr Leu Glu Leu Tyr Gln Leu Asp Glu Val Lys Asp Ala Val
          580          585          590
Gly Leu Ile Pro Lys Arg Met Leu Gly Ala Tyr Ser Tyr Gln Ala Arg
          595          600          605
Gln Leu Ile Gln Ser Gln Ile Lys Asn Asp Ser Tyr Ser Leu Pro Glu
          610          615          620
Ile Ile Lys Leu Leu Pro Phe Cys Tyr Ser Pro Lys Lys Met Leu
625          630          635          640
Phe Asp Gly Thr Phe His Phe Lys Asn Gln Met Tyr Val Arg Pro Gly
          645          650          655
Ile Asn Thr Asn Leu Phe Ser Phe Ser Lys Thr Asp Lys Ser Lys Ile
          660          665          670
Tyr Val Asn Gly Ser Ala Val Lys Ile Lys Leu Val Leu Gly Asp Asp
          675          680          685
Glu Met Asp Thr Ser Leu Ala Phe Val Glu Gly Phe Gln Val Cys Glu
          690          695          700
Tyr Asp Pro Arg Ala Pro Leu Ile Pro Arg Arg Asp Leu Arg Leu Ile
705          710          715          720
Gly Phe Gly Lys Lys Val Arg Val Phe Val Gly Gln Gly Gln Glu Lys
          725          730          735
Thr Leu Val Arg Thr Ser Ser Lys Arg Ala Ala Ser His Asp Val Ser
          740          745          750
Lys Asn Ile Arg Arg Met Arg Leu Glu Val
          755          760
<210> 12
<211> 720
<212> PRT
<213> Virut cúm C
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (406)..(408)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (712)..(712)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (714)..(715)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (717)..(717)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<400> 12
Met Ser His Gly Thr Ser Thr Lys Tyr Ser Met Glu Thr Val Ser Arg
1          5          10          15
Thr Tyr Ser Tyr Ser Arg Thr Lys Lys Glu Val Pro Ser Gly Ile Phe
          20          25          30
Pro Ile Glu Arg Arg Lys Phe Cys Asn Thr Ile Glu Asp Lys Glu Asn
          35          40          45
Leu Glu Lys Pro Asn Gly Asn Val Asp Ile Asn Phe Met Leu Ser Leu
          50          55          60
Ala Glu Met Leu Glu Glu Lys Met Gly Lys Gly Phe Phe Lys Phe Cys
65          70          75          80

```

Ala	Asn	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Ile	Leu	Lys	Met	His	Phe	Ser	Lys	Leu
			85						90					95	
Thr	Glu	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Asp	Trp	Thr	Ser	Glu	Arg	Asn	Met	Pro
			100					105					110		
Ala	Ala	Thr	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	Val	Asp	Ala	Ile	Gln	Glu	Thr	Gln
		115					120					125			
Gly	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Thr	Met	Val	Glu	Tyr	Cys	Asn	Lys	Ile	Leu
	130					135					140				
Glu	Met	Met	Asp	Trp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Lys	Lys	Val	Arg	Met	Ile
145					150					155					160
Val	Gln	Arg	His	Trp	Asp	Pro	Lys	Thr	Lys	Lys	Glu	Ile	Lys	Met	Lys
			165					170						175	
Ser	Pro	Thr	Leu	Met	Ile	Thr	Lys	Ile	Gly	Arg	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys
			180					185					190		
Arg	Ile	Cys	Thr	Ile	Asn	Thr	Met	Ala	Lys	Asp	Gly	Glu	Arg	Gly	Lys
	195					200					205				
Tyr	Lys	Arg	Arg	Ala	Ile	Ala	Thr	Pro	Gly	Met	Gly	Ile	Arg	Pro	Phe
	210					215					220				
Ser	Lys	Ile	Val	Glu	Thr	Leu	Ala	Gln	Lys	Ile	Cys	Glu	Arg	Leu	Ala
225					230					235					240
Glu	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Gly	Gly	Asn	Glu	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys
			245					250						255	
Thr	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Asn	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Gly	Gln	Phe	Met
		260						265					270		
Val	Asn	Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Ser	Lys	Trp	Asn	Glu	Cys	Gln	Gln	Pro
	275					280					285				
Glu	Ala	Tyr	Leu	Ala	Met	Leu	Ala	Tyr	Ile	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	Asn
	290				295					300					
Leu	Met	Lys	Asp	Leu	Cys	Ser	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Cys	Asn	Lys
305					310					315					320
Tyr	Val	Lys	Met	Gly	Gln	Gly	Phe	Arg	Ala	Lys	Asn	Lys	Arg	Lys	Thr
			325					330						335	
Lys	Glu	Ile	Val	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Met	Lys	Glu	Arg	Lys	Glu	Leu
		340						345					350		
Met	Asn	Ala	Glu	Trp	Arg	Asp	Leu	Phe	Glu	Thr	Ile	Glu	Pro	Tyr	Met
	355					360					365				
Asp	Gly	Glu	Cys	Cys	Phe	Leu	Gly	Gly	Gly	Met	Leu	Met	Gly	Met	Phe
	370					375					380				
Asn	Met	Leu	Ser	Thr	Val	Phe	Gly	Val	Met	Thr	Phe	Met	Thr	Leu	Ser
385					390					395					400
Ile	Thr	Glu	Glu	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Arg	Arg	Asn	Cys	Tyr	Trp	Thr
			405					410						415	
Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Asp	Asp	Phe	Val	Leu	Phe	Cys	Ile	Ser	Arg	Thr
		420						425					430		
Trp	Pro	Glu	Met	Glu	Met	Thr	Ile	Leu	Lys	Phe	Ile	Ala	Val	Cys	Lys
	435					440						445			
Leu	Met	Gly	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Lys	Ser	Tyr	Gly	Cys	Leu	Pro
	450				455						460				
Glu	Leu	Phe	Glu	Phe	Thr	Ser	Met	Phe	Phe	Ser	Gly	Asp	Phe	Val	Ser
465					470					475					480
Asn	Ile	Ala	Leu	Glu	Leu	Pro	Ala	Phe	Thr	Thr	Ala	Gly	Met	Asn	Glu
			485						490					495	
Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Ala	Ala	Met	Ser	Val	Ile	Arg	Thr	Asn	Met	Ile
		500						505					510		
Asn	Asn	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Thr	Ala	Leu	Met	Ala	Leu	Arg	Ile	Cys
	515					520						525			
Leu	Gln	Glu	Phe	Arg	Ala	Thr	Tyr	Arg	Val	His	Pro	Tyr	Asp	Ser	Gly
	530					535					540				
Val	Lys	Asn	His	Arg	Met	Lys	Ile	Ile	Arg	Lys	Phe	Ile	Glu	Thr	Ile
545					550					555					560
Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Leu	Leu	Ile	Ser	Asp	Gly	Gly	Lys	Leu	Met	Asn
			565					570					575		
Asn	Ile	Ser	Ser	Leu	His	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu
		580						585					590		
Met	Asp	Pro	Ser	Tyr	Arg	Asn	Arg	Val	Phe	Asn	Pro	Arg	Asn	Pro	Phe
	595					600						605			
Thr	Gln	Phe	Glu	Lys	Thr	Val	Asp	Ile	Phe	Lys	Ala	Ser	Gly	Pro	Ile
	610					615					620				
Arg	Val	Glu	Glu	Asn	Glu	Ala	Val	Val	Ser	Thr	His	Ser	Phe	Arg	Thr
625					630						635				640
Arg	Ser	Asn	Arg	Thr	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Met	Arg	Ala	Met	Ala	Leu
			645						650					655	
Glu	Glu	Lys	Arg	Tyr	Gln	Val	Val	Cys	Asn	Met	Tyr	Arg	Ser	Val	Phe
		660						665					670		
Glu	Ser	Ala	Asp	Val	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Ser	Met	Ser	Met	Gly	Glu
	675						680					685			
Ala	Ile	Glu	Ala	Lys	Ile	Leu	Asp	Arg	Ala	Arg	Thr	Gln	Phe	Glu	Asn
	690					695					700				
Gly	Ile	Ile	Gly	Gly	Glu	Glu	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Lys	Xaa	Arg	Lys	Ala
705					710					715					720

```

<210> 13
<211> 710
<212> PRT
<213> Virut cúm C
<400> 13
Met Ser Ser Val Ile Arg Glu Ile Ala Lys Arg Phe Leu Glu Gln Ala
1      5      10      15
Thr Ile Asn Ile Ala Glu Glu Val Val Arg Glu Tyr Gly Asp His Glu
20     25     30
Arg Thr Met Ile Ser Val Gly Val His Phe Gln Ala Cys Cys Leu Ile
35     40     45
Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Glu Asp Glu Thr Thr Pro Arg Tyr Val Leu
50     55     60
Leu Glu Gly Leu Lys Arg Gln Glu Ala Ile Ser Lys Gln Asn Asn Ile
65     70     75     80
Cys Ser Thr Leu Gly Leu Glu Pro Leu Arg Asn Leu Ala Asp Ile Phe
85     90     95
Asp Arg Lys Thr Arg Arg Phe Leu Glu Val Gly Ile Thr Lys Arg Glu
100    105    110
Ser Asp Glu Tyr Tyr Gln Glu Lys Phe Asn Lys Ile Gly Asn Asp Met
115    120    125
Asp Ile His Val Phe Thr Tyr Glu Gly Lys Tyr Phe Ser Asn Asn Pro
130    135    140
Asn Gly Leu Glu Asp Ile Gln Lys Thr Arg Ile Phe Thr Phe Leu Ser
145    150    155    160
Phe Val Ser Asp Glu Leu Arg Lys Glu Asn Met Phe Thr Glu Met Tyr
165    170    175
Val Thr Glu Glu Gly Ala Pro Glu Leu Glu Met Tyr Lys Ser Lys Leu
180    185    190
Phe Ile Ala Met Arg Asp Glu Ser Val Pro Leu Pro Tyr Ile Asn Tyr
195    200    205
Glu His Leu Arg Thr Arg Cys Glu Thr Phe Lys Arg Asn Gln Ala Glu
210    215    220
Cys Glu Ala Lys Val Ala Asp Val Ala Ser Arg Leu Lys Ile Lys Leu
225    230    235    240
Glu His Leu Glu Glu Asn Lys Leu Arg Pro Leu Glu Ile Pro Lys Glu
245    250    255
Lys Glu Ala Pro Tyr Thr His Lys Phe Leu Met Lys Asp Ala Trp Phe
260    265    270
Phe Ala Lys Pro His Asp Ser Glu Arg Ala Gln Pro Gln Gln Ile Leu
275    280    285
Tyr Asp Phe Phe Glu Ala Ala Asn Met Gly Phe Met Thr Thr Ser Pro
290    295    300
Lys Pro Ile Phe Gly Lys Gln Gly Leu Met Tyr His Ser Leu Trp Gly
305    310    315    320
Gln Thr Lys Arg Ala Ile Lys Asp Lys Arg Asn Glu Leu Glu Pro Ser
325    330    335
Glu Gln Arg Asp Phe Leu Cys Gly Ile Gly Arg Ala Ser Lys Lys Ile
340    345    350
Gln Glu Asp Lys Trp Gln Glu Ser Arg Glu Glu Glu Phe Lys Gln Glu
355    360    365
Glu Thr Lys Gly Ala Ala Lys Arg Gly Phe Pro Thr Trp Phe Asn Glu
370    375    380
Glu Trp Leu Trp Ala Met Arg Asp Ser Gly Asp Gly Asp Asn Lys Ile
385    390    395    400
Gly Asp Trp Ile Pro Met Ala Glu Met Pro Pro Cys Lys Asn Glu Met
405    410    415
Glu Asp Tyr Ala Lys Lys Met Cys Glu Glu Leu Glu Ser Lys Ile Gln
420    425    430
Gly Thr Asn Cys Ala Arg Glu Met Ser Lys Leu Ile His Thr Ile Gly
435    440    445
Ser Leu His Thr Glu Cys Arg Asn Phe Pro Gly Lys Val Lys Ile Val
450    455    460
Pro Ile Tyr Cys Arg Gly Thr Leu Arg Gly Glu Ser Thr Asp Cys Leu
465    470    475    480

Phe Gly Ile Ala Ile Lys Gly Lys Ser His Leu Asn Lys Asp Asp Gly
485    490    495
Met Tyr Thr Val Val Thr Phe Glu Phe Ser Thr Glu Glu Pro Asn Pro
500    505    510
Ser Lys His Glu Lys Tyr Thr Val Phe Glu Ala Gly Thr Val Pro Val
515    520    525
Glu Ala Val Val Leu Thr Pro Lys Arg Glu Arg Val Leu Lys Glu Lys
530    535    540
Lys Leu Phe Leu Tyr Cys Arg Thr Thr Gly Met Ser Lys Leu Lys Asn
545    550    555    560
Asp Trp Phe Ser Lys Cys Arg Arg Cys Leu Ile Pro Thr Met Glu Thr
565    570    575
Val Glu Gln Ile Val Leu Lys Glu Cys Ala Leu Lys Glu Glu Asn Arg
580    585    590

```

Val Ser Glu Met Leu Glu Asn Lys Arg Ala Trp Ile Ala His Glu Asn
 595 600 605
 Gly Glu Asn Leu Thr Arg Leu Val Ser Thr Lys Leu Lys Asp Leu Cys
 610 615 620
 Arg Met Leu Ile Val Thr Gln Phe Tyr Tyr Cys Ile Tyr Asn Asp Asn
 625 630 635 640
 Gln Leu Glu Gly Phe Cys Asn Glu Gln Lys Lys Phe Leu Met Phe Leu
 645 650 655
 Gln Ala Asp Lys Asp Ser Lys Ser Ala Phe Thr Phe Asn Gln Lys Gly
 660 665 670
 Leu Tyr Glu Lys Ile Glu Glu Cys Ile Val Ser Asn Pro Leu Cys Ile
 675 680 685
 Phe Leu Ala Asp Arg Leu Asn Lys Leu Phe Leu Val Ala Lys Ser Asn
 690 695 700
 Gly Ala Lys Tyr Phe Glu
 705 710
 <210> 14
 <211> 636
 <212> PRT
 <213> Virut cúm C
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (338)..(338)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (340)..(341)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (343)..(343)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (345)..(347)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (537)..(537)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (540)..(540)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (545)..(545)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (547)..(547)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (549)..(554)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (598)..(598)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (600)..(604)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (606)..(606)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <400> 14
 Met Phe Leu Leu Leu Ala Thr Ile Thr Ala Ile Thr Ala Cys Gln Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Glu Leu Ile Cys Ile Val Gln Arg Val Asn Glu Ser Phe Ser
 20 25 30
 Leu His Ser Gly Phe Gly Gly Asn Val Tyr Ser Met Lys Thr Glu Pro
 35 40 45
 Met Thr Gly Phe Thr Asn Val Thr Lys Gly Ala Ser Val Ile Asn Gln
 50 55 60
 Lys Asp Trp Ile Gly Phe Gly Asp Ser Arg Thr Asp Leu Thr Asn Asp
 65 70 75 80
 Gln Phe Pro Ala Ser Ser Asp Val Pro Leu Ala Val Ala Lys Lys Phe

```

<210> 15
<211> 552
<212> PRT
<213> Virut cúm C
<220>
<221> Trình tự lỗi
<222> (541)..(542)
<223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
<400> 15
Met Asp Ser Thr Lys Ala Gln Thr Pro Glu Glu Gln Arg Ala Lys Asn
1 5 10 15

```

Ala Lys Thr Ile Leu Glu Asn Ile Gln Ile Tyr Glu Arg Met Cys Asp
 20 25 30
 Leu Phe Gly Val Ser Glu Asp Asp Lys Leu Ile Ile Glu Asn Ser Ile
 35 40 45
 Ser Ile Glu Arg Met Ile Arg Val Val Thr Asp Lys Lys Tyr Gln Asp
 50 55 60
 Lys Lys Leu Lys Asn Ala Gly Ser Asp Pro Glu Lys Ile Ala Asn Ala
 65 70 75 80
 Gly Lys Val Phe Cys Arg Leu Val Glu Ser Thr Ala Gly Lys Cys Ser
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Met Ala Leu Lys Pro Asn Val Glu Ala Val Leu Thr
 100 105 110
 Asp Val Leu Gly Asn Glu Leu Asp Arg Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg
 115 120 125
 Met Gly Phe Ser Ala Met Phe Lys Ser Asn Leu Glu Glu Val Leu Tyr
 130 135 140
 Gln Arg Gly Lys Asn Gln Leu Lys Lys Arg Asn Ala Ala Glu Thr Phe
 145 150 155 160
 Thr Leu Ser Gln Gly Ala Ser Leu Glu Ala Arg Phe Arg Pro Ile Met
 165 170 175
 Glu Lys His Leu Gly Val Gly Thr Val Val Ala Ser Ile Lys Asn Ile
 180 185 190
 Leu Ala Ser Lys Lys Asn Gly Asn Tyr Arg Asn Lys Met Val Arg Lys
 195 200 205
 Pro Gly Gly Asn Arg Glu Ser Trp Ser Pro Leu Glu Arg Glu Ile Ser
 210 215 220
 Phe Leu Asn Lys Lys Leu Phe Pro Gly Pro Met Arg Gln Leu Cys Lys
 225 230 235 240
 Lys Phe Glu Tyr Leu Asn Glu Gln Glu Lys Gln Leu Ala Leu Asn Leu
 245 250 255
 Met Leu Asp Ala Ser Leu Ile Leu Lys Pro Gln Val Thr His Lys Met
 260 265 270
 Ile Met Pro Trp Ser Met Trp Leu Ala Val Lys Lys Tyr Ala Glu Met
 275 280 285
 Asn Lys Gly Ser Pro Ser Leu Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Ser Gly Val
 290 295 300
 Arg Ala Phe Met Ala Phe Asn Thr Ala Cys Tyr Met Ser Lys Phe Thr
 305 310 315 320
 Ile Gly Lys Gly Ile Val Gly Asp Ala Glu Ile Met Glu Asn Gly Asn
 325 330 335
 Asp Lys Met Gln Thr Leu Ala Met Ala Cys Phe Gly Leu Ala Tyr Glu
 340 345 350
 Asp Thr Gly Ile Val Ala Ala Met Ile Ser Gln Pro Met Lys Lys Arg
 355 360 365
 Tyr Gln Leu Arg Val Gly Asn Phe Asn Pro Pro Glu Lys Gly Thr Ile
 370 375 380
 Lys Gly Thr Ser Ala Gly Tyr Phe His Lys Trp Ala Glu Phe Gly Asn
 385 390 395 400
 Arg Leu Pro Phe Asn Ser Phe Gly Thr Gly Glu Ser Lys Gln Ile Ser
 405 410 415
 Asn Ser Gly Val Phe Ala Val Gln Arg Pro Ser Thr Thr Asn Ile Gln
 420 425 430
 Arg Leu Ala Glu Leu Met Ala Arg Asn Thr Gly Glu Thr Ser Asp Asn
 435 440 445
 Phe Thr Gln Leu Val Gln Lys Ile Arg Glu Gln Val Gly Ala Phe Ala
 450 455 460
 Asp Gln Lys Ala Asn Leu Arg Glu Phe Thr Gly Gly Tyr Ile Tyr Asp
 465 470 475 480
 Ile Thr Asp Val Thr Lys Ser Asn Pro Lys Ile Pro Gln Leu Gly Gly
 485 490 495
 Asp Ser Phe Phe Glu Phe Thr Gly Ser Asp Val Pro Arg Thr Gly
 500 505 510
 Ala Lys Arg Arg Val Gly Gly Ala Asp Asp Val Thr Pro Gly Thr Ser
 515 520 525
 Gln Pro Lys Lys Arg Gly Arg Gln Gly Ala Gly Ala Xaa Xaa Ser Met
 530 535 540
 Asp Ile Glu Thr Val Gly Glu Asp
 545 550
 <210> 16
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Virut cúm C
 <220>
 <221> Trình tự lỗi
 <222> (394)..(394)
 <223> Xaa có thể là axit amin bất kỳ có trong tự nhiên
 <400> 16
 Met Ala Gln Glu Gln Leu Leu Ala Glu Leu Glu Gly Tyr Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Pro Met Thr Arg Gln Thr Ile Met Lys Ser Ala Arg Gly Gly

20 25 30
 Met Asp Ser Ala Lys Glu Ala Ala Lys Ala Ala Lys Lys Gly Glu Met
 35 40 45
 Gln Leu Thr Ser Gly Glu Ser Ile Val Val His Ile Cys Leu Arg Ala
 50 55 60
 Met Tyr Pro Gly Ile Lys Pro Trp Ser Glu Ala Lys Lys Asp Leu Asp
 65 70 75 80
 Lys Ala Thr Glu Gly Leu Ser Gly Lys Asp Cys Lys Asn Ile Arg Lys
 85 90 95
 Ala Leu Arg Lys Ala Gly Asp Leu Thr Gly Ile Lys Glu Met Met Met
 100 105 110
 Met Tyr Glu Met Arg Glu Asp Lys Lys Ala Glu Met Val Glu Gln Ile
 115 120 125
 Tyr Asp Asp Pro Glu Asp Phe Thr Glu Asp Val Arg Leu Gly Thr Val
 130 135 140
 Ala Ala Trp Leu Gln Cys Lys Asn Lys Arg Ser Glu Lys Tyr His His
 145 150 155 160
 Lys Met Ser Met Ser Gly Ser Thr Ala Leu Ala Leu Gly Asp Ala Gln
 165 170 175
 Lys Ala Gly Met Ala Ile Glu Asn Met Ala Ser Val Val Pro Met Lys
 180 185 190
 Lys Glu Ala Gln Ala Leu His Lys Asp Ala Glu Val Leu Ile Glu Leu
 195 200 205
 Ala Arg Ile Ala Tyr Gly Ser Arg Ala Met Glu Gly His Leu Gln Asn
 210 215 220
 Ala Met Asp Gly Ile Gly Ser Lys Val Ser Gly Met Ala Asn Leu Ala
 225 230 235 240
 Leu Lys Arg Ser Val Leu Thr Leu Leu Met Leu Val Ile Cys Gly Ile
 245 250 255
 Pro Thr Cys Val Asn Ala Glu Thr Val Glu Glu Phe Cys Arg Lys Lys
 260 265 270
 Leu Asn Gln Thr Glu Glu Lys Val Tyr Val His Cys Phe Asn Glu Asp
 275 280 285
 Asp Gly Arg Ala Met Thr Leu Ala Ala Leu Ile Leu Gly Cys Phe Ser
 290 295 300
 Met Leu Tyr Ile Leu Ile Lys Ala Ile Leu Met Leu Leu Thr Ile
 305 310 315 320
 Ile Asn Gly Arg Pro Asn Gly Ser Trp Asp Asp Leu Lys His Val Val
 325 330 335
 Lys Cys Phe Ser Glu Thr Gly Ser Glu Asn Phe Ala Arg Asp Ile Met
 340 345 350
 Val Leu Glu Ser Arg Arg Asp Gly Glu Glu Thr Ser Ser Pro Glu Glu
 355 360 365
 Gly Leu Gly Pro Pro Leu Ser Gly Phe Asn Glu Met Val Tyr Ser Trp
 370 375 380
 Lys His Tyr Ile Pro Gly Glu Val Leu Xaa Ser Ser Leu
 385 390 395
 <210> 17
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Virut cúm C
 <400> 17
 Met Ser Glu Asn Lys Ser Val Asn Thr Thr Asn Ile Arg Ala Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Glu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Ser Trp Met Asp Ser Ser Gly Leu
 20 25 30
 Met Thr Phe Glu Lys Met Arg Lys Ser Ala Glu Asn Ser Leu Arg Val
 35 40 45
 Glu Gln Val Tyr Glu Pro Arg Thr Trp Glu Asp Ala Val Ala Glu Gly
 50 55 60
 Arg Glu Ile Leu Gly Phe Thr Thr Ile Ala Ala Leu Arg Lys Pro Glu
 65 70 75 80
 Glu Thr His Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Ile Ile Tyr Pro Leu Gly
 85 90 95
 Gly Asn Pro Phe Tyr Leu Ser Pro Cys Thr Ile Asp Thr Leu Tyr Glu
 100 105 110
 Pro Lys Leu Ile Arg Gln Gly Glu Val Phe Gly Val Lys Tyr Arg Asn
 115 120 125
 Cys Asn Cys Phe Val Lys Thr Ala Glu Leu Leu Val Thr Asp Met Gly
 130 135 140
 Glu Ile Ile Val Leu Phe Cys Arg Asn Thr Glu Lys Pro Ala Tyr Cys
 145 150 155 160
 Leu Lys Asn Phe Arg Arg Gly Asp Asp Pro Glu Lys Ser Val Arg Lys
 165 170 175
 Ile Leu Arg Ile Trp Arg Ser Gly Leu Val Val Ala Val Asp Ala Glu
 180 185 190
 Ser Arg Asp Glu Ile Arg Arg Tyr Lys Ser Gly Cys Glu Thr Asp Pro
 195 200 205
 Phe Trp Arg Arg Glu Gly Ala Thr Thr Gly Glu Val Gln Glu Leu Leu
 210 215 220

Gly Val Ile Asp Lys Val Glu Ile Gln Ala Gly Ser Ser Asp Gly Glu
 225 230 235 240
 Leu Phe Asp
 <210> 18
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Virut cúm C
 <400> 18
 Met Ser Glu Asn Lys Ser Val Asn Thr Thr Asn Ile Arg Ala Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Glu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Ser Trp Met Asp Ser Ser Gly Leu
 20 25 30
 Met Thr Phe Glu Lys Met Arg Lys Ser Ala Glu Asn Ser Leu Arg Val
 35 40 45
 Glu Gln Val Tyr Glu Pro Arg Thr Trp Glu Asp Ala Val Ala Glu Met
 50 55 60
 Thr Gln Arg Ser Gln Tyr Glu Arg Tyr Ser Glu Phe Gly Glu Val Asp
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Pro Leu Met Arg Asn Leu Glu Met Lys Ser Asp Asp Thr
 85 90 95
 Asn Leu Asp Val Lys Gln Ile Pro Ser Gly Glu Glu Lys Ala Gln Leu
 100 105 110
 Leu Glu Arg Phe Arg Ser Cys Leu Val Ser Leu Ile Arg Leu Lys Ser
 115 120 125
 Lys Leu Gly Val Ala Met Val Asn Ser Leu Thr Asn Gln Asp Met Arg
 130 135 140
 Ala Ala Leu Asp Glu Ile Lys Ser Val Ser Arg Thr Ile Ser Met Leu
 145 150 155 160
 Lys Glu Cys Ile Arg Ser Leu Val
 165

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vaccin bảo vệ động vật có vú kháng lại sự lây nhiễm virus cúm C, chứa chất mang được dụng và lượng có tác dụng miễn dịch của virus cúm C ở lợn được bất hoạt bằng etylenimin hai chức và chất bổ trợ dạng dầu trong nước; trong đó virus này chứa ít nhất một axit nucleic mã hóa tám polypeptit của virus cúm C (PB1, PB2, P3, HE, NP, M, NS1 và NS2) có các trình tự như nêu trong SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17 và SEQ ID NO.18.
2. Vaccin theo điểm 1, trong đó chủng virus cúm C phân lập này được phân lập từ lợn.
3. Vaccin theo điểm 2, trong đó chủng virus cúm C phân lập này có khả năng lây nhiễm cho chồn sương.
4. Vaccin theo điểm 2, trong đó vaccin này bảo vệ lợn chống lại sự lây nhiễm chủng virus cúm C phân lập này.
5. Vaccin theo điểm 1, trong đó vaccin này chứa chất bổ trợ dạng dầu trong nước ở hàm lượng khoảng 10%.
6. Vaccin theo điểm 1 hoặc 5, trong đó vaccin này chứa chất bổ trợ dạng dầu trong nước ở hàm lượng bằng 10%.
7. Vaccin theo điểm 1, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, hoặc hỗn hợp của chúng.
8. Vaccin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 4.
9. Vaccin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 6.
10. Vaccin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 8.
11. Vaccin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 10.
12. Vaccin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 12.

13. Vacxin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 14.

14. Vacxin theo điểm 7, trong đó axit nucleic này chứa trình tự như nêu trong SEQ ID NO. 16.

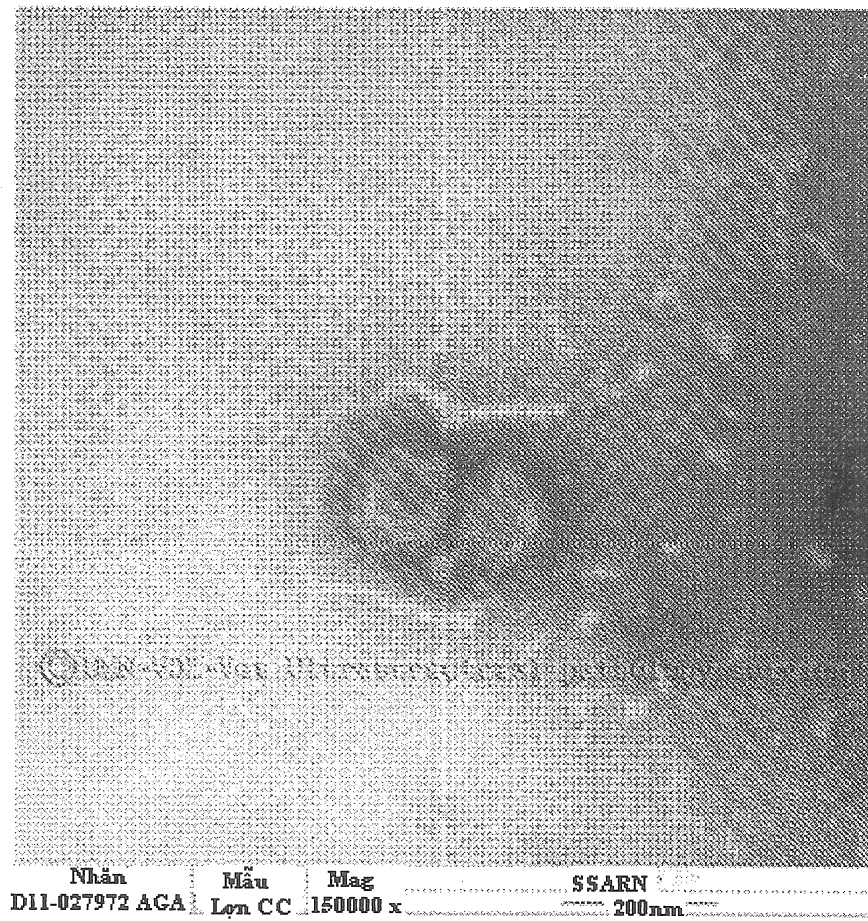


Fig.1

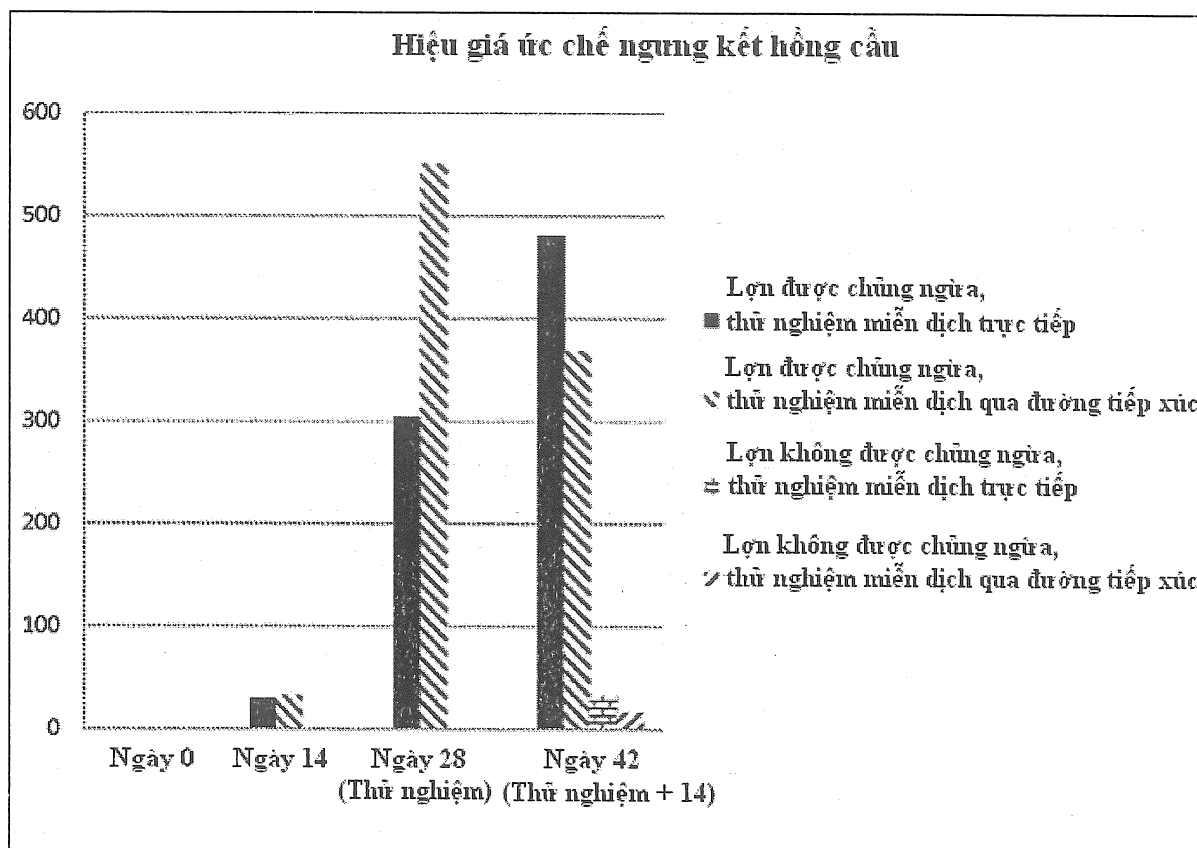


Fig.2

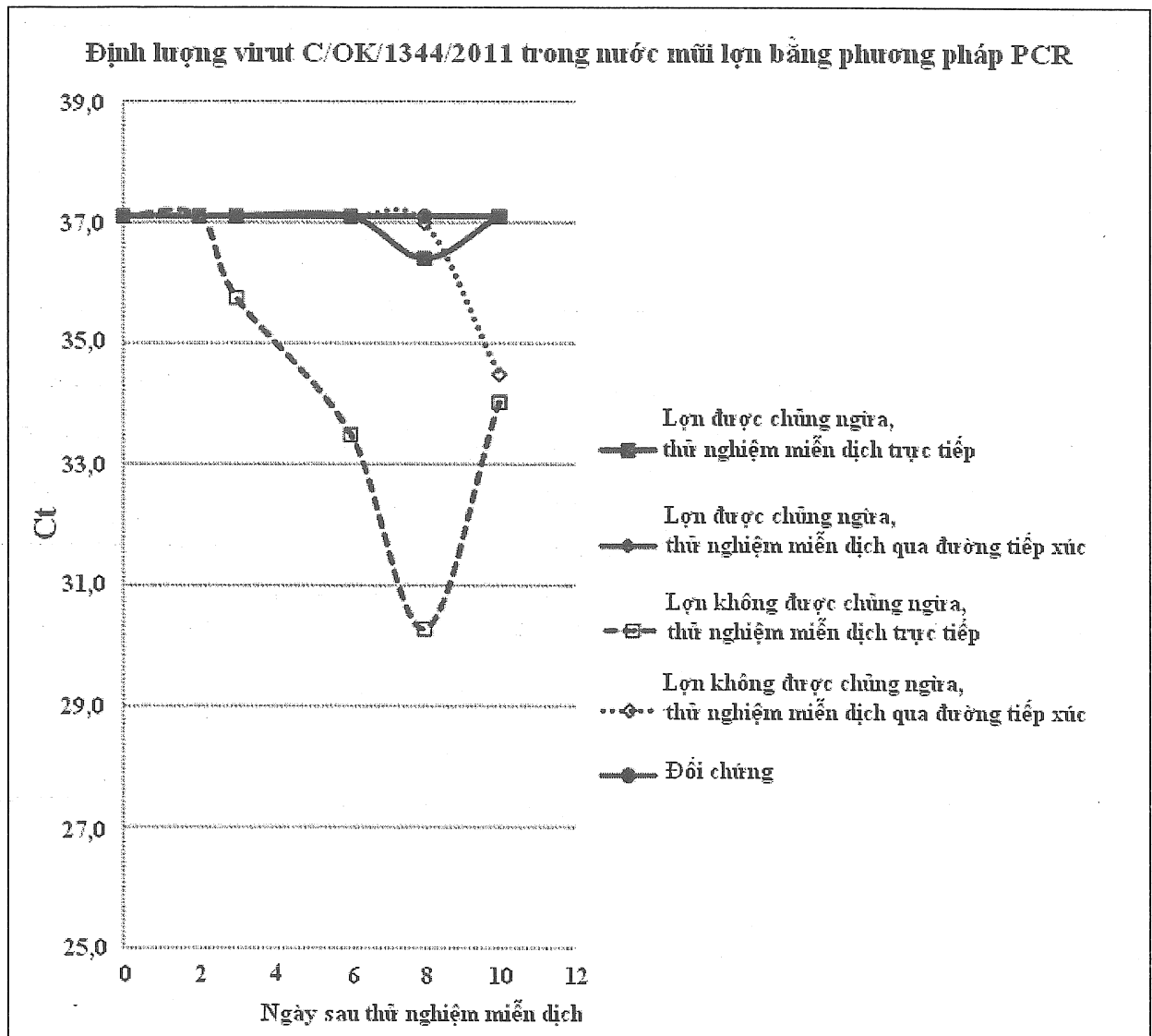


Fig.3

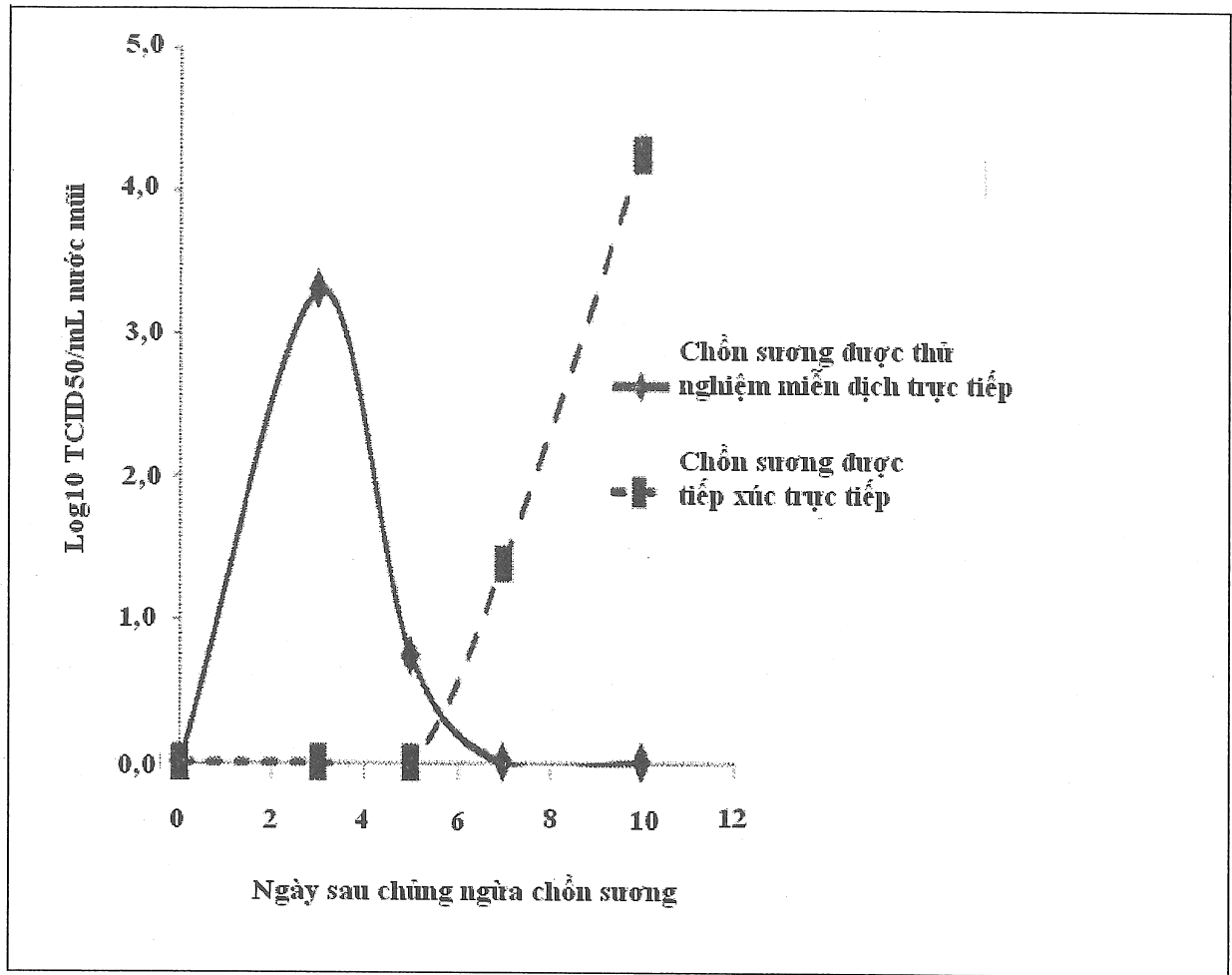


Fig.4