

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất các phương pháp để tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh phục vụ cho ngành nuôi trồng thủy sản, ngành kinh doanh bể cá cảnh, và kiểm soát các loài xâm lấn. Các phương pháp bao gồm việc phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục thông qua việc đưa các hợp chất vào làm cho tuyến sinh dục không thể phát triển mạnh. Hợp chất này có thể được đưa vào trứng trước hoặc sau khi thụ tinh (hoặc kích hoạt nước) bằng cách cho trứng chưa thụ tinh hoặc đã thụ tinh tiếp xúc với hợp chất mong muốn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nuôi trồng thủy sản ngày càng trở nên quan trọng để giải quyết vấn đề thiếu hụt toàn cầu ở hiện tại và theo kế hoạch đối với thức ăn thủy sản và nguồn hải sản sẵn có. Bởi vì tiếp tục có sự chuyển dịch phụ thuộc từ việc đánh bắt thủy sản của ngư dân sang các loài thủy sản được con người nhân giống, việc tối ưu hóa các phương pháp nuôi trồng thủy sản ngày càng cần thiết để tối đa hóa sản lượng lương thực và giảm thiểu tác động sinh thái, do đó đạt được sự ổn định bền vững dài hạn về môi trường đối với nguồn cung cấp hải sản của chúng ta.

Việc mất khả năng sinh sản (vô sinh tự gây ra) ở cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi trồng khác giúp tăng cường tốc độ sinh trưởng của chúng bằng cách tăng chuyển hóa năng lượng thức ăn thành sự sinh trưởng cơ bắp, thay vì phát triển tuyến sinh dục. Ngoài ra, nếu thoát khỏi môi trường nuôi trồng thủy sản ra môi trường bên ngoài, cá nuôi và các động vật thủy sinh đẻ trứng khác bị mất khả năng sinh sản, bao gồm loài thuần hóa, không phải bản địa hoặc biến đổi gen, sẽ không thể tái sinh sản hoặc lai giống với quần thể hoang dã. Điều này sẽ hỗ trợ cho việc ngăn chặn sinh học và phòng ngừa ô nhiễm gen di truyền của quần thể hoang dã và/hoặc sự hình thành trong tự nhiên các loài cá và các động vật thủy sinh đẻ trứng đã thuần hóa, không phải bản địa hoặc biến đổi gen được nuôi trồng.

Ngoài ra, việc làm mất khả năng sinh sản của cá và các động vật thủy sinh đẻ trứng khác ngăn chặn việc nhân giống trái phép hoặc mua bán các loài cá và các động vật thủy

sinh đẻ trứng khác được bảo hộ theo sáng chế, hoặc cách khác được bảo vệ, được chọn lọc gen hoặc biến đổi gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế bộc lộ các phương pháp tạo ra quần thể động vật thủy sinh đẻ trứng bị vô sinh, trong đó các phương pháp gây vô sinh bao gồm việc phá vỡ sự di chuyển của tế bào phôi nguyên thủy và/hoặc sự phát triển ở từng cá thể riêng được xử lý mà không gây ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính khác của một sinh vật bình thường.

Một khía cạnh của sáng chế liên quan đến phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh, phương pháp này bao gồm việc cho trứng chưa thụ tinh hoặc trứng đã thụ tinh, trước khi kích hoạt nước, tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa mà hiệu quả để chuyển gen cho trứng và làm cho cá thể được tạo ra từ đó cũng bị vô sinh.

Tuy nhiên, một khía cạnh khác của sáng chế liên quan đến phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh, phương pháp này gồm việc cho trứng chưa thụ tinh hoặc trứng đã thụ tinh, trước khi kích hoạt nước, tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa mà hiệu quả để chuyển gen cho trứng và làm cho cá thể được tạo ra từ đó vô sinh, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với một hợp chất vận chuyển phân tử hiệu quả trong việc vận chuyển màng đệm của liên hợp. Các hợp chất vận chuyển phân tử ví dụ bao gồm một dendrim octaguanidin gồm một nửa lõi triazin.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh, phương pháp này gồm việc cho trứng đã thụ tinh tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa liên hợp với một hợp chất vận chuyển phân tử hiệu quả trong việc chuyển gen cho trứng đã thụ tinh và làm cho cá thể được tạo ra từ đó cũng bị vô sinh.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp để đưa các hợp chất vào trứng từ động vật thủy sinh đẻ trứng được đề cập bao gồm việc cho trứng chưa được thụ tinh hoặc trứng trước khi được kích hoạt nước tiếp xúc với một hợp chất có lợi sinh học hay một tiếp hợp của hợp chất có lợi sinh học và một hợp chất vận chuyển phân tử chứa dendrime octaguanidin gồm một nửa lõi triazin.

Một khía cạnh khác của sáng chế liên quan đến một chế phẩm để xử lý trứng cá để làm cho cá được tạo ra từ đó mất khả năng sinh sản, chế phẩm đó gồm oligome

Morpholino đối nghĩa gồm một oligome được lựa chọn từ các nhóm gồm các oligome của chuỗi SEQ ID NOS: 1-4 và các biến thể của nó có hiệu quả trong việc làm mất khả năng sinh sản của cá khi tiếp xúc với trứng cá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến một chế phẩm trong đó oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với một hợp chất vận chuyển phân tử hiệu quả trong việc vận chuyển qua màng đệm của liên hợp, trong đó các hợp chất vận chuyển phân tử gồm một dendrime octaguanidin gồm một nửa lõi triazin.

Các khía cạnh khác, các đặc tính và ưu điểm của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng hơn với phần mô tả và yêu cầu bảo hộ đi kèm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ khối theo chu trình thể hiện phương pháp ngâm theo các phương án của sáng chế.

Fig.2 là sơ đồ khối theo chu trình thể hiện việc tạo ra cá mất khả năng sinh sản thu được từ các phương án khác của sáng chế.

Fig.3 là một ảnh chụp cho thấy kết quả của việc ngâm phôi cá ngựa vằn trong một bồn ngâm của thể vận chuyển phân tử Vivo liên hợp với dnd-MO. Trong Fig.3A, chất kết tụ không có đặc tính được tìm thấy trong phôi cá sau 3 giờ ngâm với 20 μ M zfdnd-MO-Vivo. Trong Fig.3B, nhiều chất kết tụ xuất hiện sau 5 giờ ngâm. Trong Fig.3C và Fig.3D, chất kết tụ không tìm thấy trong phôi được ngâm với 20 μ M zfdnd-MO trong (3C) 3 giờ và (3D) 5 giờ (không có Vivo).

Fig.4 là một ảnh chụp kính hiển vi huỳnh quang cho thấy những tác động của việc đưa vào phôi cá của một thể vận chuyển phân tử liên hợp với một oligome Morpholino đối nghĩa (MO) có thể ngăn chặn một cách hiệu quả việc dịch mã của protein Dead end (Dnd). Fig.4A cho thấy ở cá thể cá bình thường, các tế bào phôi di chuyển đến vùng cơ quan sinh dục và duy trì hình thái của chúng. Fig.4B cho thấy việc xử lý zfw-MO-Vivo gây ra sự di chuyển lệch hướng của tế bào phôi và thậm chí phân hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau.

Fig.5 là hình một bức ảnh và hình biểu đồ cho thấy phôi cá ngựa vằn được xử lý dnd-MO-Vivo phát triển thành cá trưởng thành giống như cá được mất khả năng sinh sản. Fig.5A cho thấy không có sự khác biệt về ngoại hình hoặc kích thước tổng thể quan sát

được giữa cá trưởng thành được xử lý và cá đực loài hoang dã. Fig.5B cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về trọng lượng cơ thể của cá 3 tháng tuổi ($n = 12$ bằng cách lấy mẫu ngẫu nhiên) trong số cá được xử lý zfdnd-MO-Vivo, và cá đực loài hoang dã không được xử lý.

Fig.6 là một ảnh chụp kính hiển vi cho thấy sự vô sinh được gây ra bởi zfw-MO-Vivo ở cá ngựa vằn. Các cuộc kiểm tra mô tuyến sinh dục (Fig.6A.) cho thấy tinh hoàn của cá đực không được xử lý phát triển tốt; (FIG 6B.) cho thấy buồng trứng ở cá cái không được xử lý phát triển tốt; (Fig.6C) cho thấy tuyến sinh dục của cá đực được xử lý bằng zfdnd-MO-Vivo phát triển thành mô dạng sợi mỏng. Ảnh chụp hiển vi (6D-6F) cho thấy (Fig.6D) sự sinh tinh đang hoạt động của tinh hoàn ở cá đực không được xử lý; (Fig.6E) cho thấy buồng trứng phát triển tốt của cá cái không được xử lý với noãn bào ở các giai đoạn phát triển khác nhau; (Fig.6F) tuyến sinh dục của cá đực được xử lý dường như kém phát triển và được bao quanh với một số lượng lớn các tế bào tạo mỡ mà không có cấu trúc sinh dục hoặc tế bào phôi phát triển vượt trội.

Fig.7 là biểu đồ thể hiện phôi cá ngựa vằn được xử lý với dnd-MO-Vivo phát triển thành cá trưởng thành vô sinh. Trong cả hai hình vẽ Fig.7A, được ngâm trong 24 giờ, và Fig.7B, ngâm trong 5-6 giờ, tất cả các phôi mà ban đầu được ngâm với 60 hoặc 40 μ M zfdnd-MO-Vivo đều phát triển thành cá vô sinh.

Fig. 8 biểu đồ thể hiện phôi cá ngựa vằn được xử lý với dnd-MO-Vivo phát triển thành cá trưởng thành vô sinh. Trong một số điều kiện tối ưu, khi việc ngâm được bắt đầu ngay lập tức sau khi thụ tinh và kéo dài đến 24 giờ (hoặc giai đoạn phân hóa PRIM-5) và 5-6 giờ (hoặc giai đoạn phôi bì 50%), tất cả các phôi mà ban đầu được ngâm với 60 hoặc 40 μ M zfdnd-MO-Vivo đều phát triển thành cá vô sinh.

Fig.9 là ảnh chụp kính hiển vi cho thấy trứng đã thẩm thấu hơn trước khi kích hoạt nước. Khi ngâm trong 5 giờ với 40 μ M zfdnd-MO-Fhx, như thể hiện trong Fig.9A, trứng chưa thụ tinh hấp thụ nhiều zfdnd-MO-Fhx (huỳnh quang màu xanh lá cây mạnh hơn) hơn trứng trước khi được kích hoạt nước như thể hiện trong Fig.9B.

Fig.10 minh họa một phần của cá được sử dụng cho chiết xuất ARN và kết quả thu được. Trứng cá hồi được ngâm với dnd-MO của họ cá hồi tại A: Cá thể bình thường; B: 10 μ M Ssdnd-MO; C: 10 μ M Ssdnd-MO + 1 μ M Ssdnd-MO-Vivo; D: 10 μ M Ssdnd-MO +

2 μ M Ssdnd-MO-Vivo trong 48 giờ trước khi thụ tinh. Khi trứng đã được xử lý với 10 μ M Ssdnd-MO + 1 μ M Ssdnd-MO-Vivo hoặc 10 μ M Ssdnd-MO + 2 μ M Ssdnd-MO-Vivo, tế bào gốc đã được loại bỏ do thiếu sự biểu hiện của chất đánh dấu đặc trưng tế bào phôi - gen vasa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế này liên quan đến một khía cạnh để đưa các hợp chất có lợi vào trứng từ cá hoặc động vật thủy sinh để trứng khác bằng cách cho trứng tiếp xúc với các hợp chất trước khi thụ tinh hoặc kích hoạt nước. Việc đưa các hợp chất có ích vào cá hoặc động vật thủy sinh để trứng khác được thực hiện theo cách truyền thống thông qua các thức ăn, tiêm, hoặc ngâm phôi hoặc cá thể trong một hợp chất mong muốn. Việc tiêm thuốc hàng loạt, tuy nhiên, là không khả thi trong hoạt động nuôi trồng thủy sản thương mại có quy mô lớn. Hơn nữa, việc sử dụng phương thức ngâm trứng đã thụ tinh và trứng đã kích hoạt nước là hạn chế, do tính thấm thấu thấp của màng đệm của trứng, một lớp phủ vô bào dày nhiều lớp, còn được gọi là màng trứng, gồm chủ yếu là prôtêin và glycoprôtêin. Thông thường, trong quá trình xử lý ngâm cá hoặc phôi của động vật thủy sinh để trứng khác, các hợp chất phân tử lớn không thể đi qua màng đệm và đi đến phôi.

Sau khi rụng trứng/để trứng và trước khi thụ tinh và kích hoạt nước, trứng có màng đệm thấm và đục lỗ (hoặc màng phủ ngoài cùng) cho phép nước và các chất thâm nhập vào trong trứng chưa thụ tinh qua các khe hở hoặc lỗ trứng, một kênh nhỏ trong màng đệm của trứng cho phép tinh trùng thâm nhập vào trứng để thụ tinh. Sau khi thụ tinh và kích hoạt nước, màng đệm bị bịt kín và trứng được làm cho không thấm nước, ngăn chặn sự hấp thụ thêm các chất hoặc nước từ môi trường bên ngoài.

Như đã được phát hiện, trong suốt khoảng thời gian giữa giai đoạn rụng trứng/để trứng và thụ tinh/kích hoạt nước, trứng được thấm thấu và việc hấp thụ các hợp chất từ môi trường nhúng vào trứng là hiệu quả. Sau một thời gian ngâm ngắn, trứng được thụ tinh và kích hoạt nước tại thời điểm mà chúng trở nên không thấm nước và bắt đầu quá trình phát triển phôi thai.

Sáng chế này theo một số khía cạnh mô tả phương pháp để đưa hợp chất vào trứng của động vật thủy sinh để trứng một cách hiệu quả bằng cách cho trứng tiếp xúc với các hợp chất mong muốn trong một khoảng thời gian khi trứng được thấm thấu với chất bên

ngoài môi trường, ví dụ, sau khi rụng trứng/đẻ trứng và trước khi thụ tinh hoặc sau khi thụ tinh và trước khi kích hoạt nước. Theo các phương án khác nhau, việc tiếp xúc bao gồm ngâm trứng trong môi trường có chứa một hoặc nhiều hợp chất mong muốn.

Theo đó, trong các khía cạnh khác, sáng chế này liên quan đến việc cho trứng chưa thụ tinh, trứng đã thụ tinh trước khi kích hoạt nước tiếp xúc với một hợp chất trong môi trường ngâm nhúng. Các hợp chất được sử dụng trong các môi trường ngâm có thể hỗ trợ cho việc làm mất khả năng sinh sản của các loài động vật thủy sinh đẻ trứng, và môi trường ngâm theo các phương án cụ thể có thể bao gồm các hợp chất bổ sung hoặc các vật liệu khác có lợi cho các loài thủy sinh đẻ trứng nở từ trứng được tiếp xúc với môi trường ngâm, ví dụ như ADN/ARN, hoóc-môn, chất kích thích tăng trưởng, kháng nguyên bảo vệ, chất dinh dưỡng, v.v..

Sáng chế do vậy còn tính đến các phương pháp tạo động vật thủy sinh đẻ trứng mất khả năng sinh sản bao gồm việc cho trứng trong môi trường ngâm tiếp xúc với các hợp chất được lựa chọn dẫn đến từng cá thể mất khả năng sinh sản. Các phương pháp làm mất khả năng sinh sản bao gồm bước phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục trong phôi thai. Sáng chế này cũng liên quan đến các phương pháp ngăn ngừa giao phối giữa cá /các động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi trồng, đã thuần hóa, không phải bản địa và biến đổi gen với các loài hoang dã, cũng như việc hình thành các loài cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác được nuôi trồng trong môi trường tự nhiên. Ngoài ra, các phương pháp bộc lộ có thể được sử dụng để hỗ trợ việc phòng ngừa ô nhiễm di truyền của một quần thể hoang dã bởi cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác được nuôi trồng.

Các phương pháp theo sáng chế được áp dụng đối với động vật thủy sinh đẻ trứng. Khi sử dụng ở đây, các động vật thủy sinh đẻ trứng bao gồm các loài động vật mang trứng sống ở nước bao gồm tất cả các loài cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác như động vật giáp xác và/hoặc động vật thân mềm.

Theo đó, các động vật thủy sinh đẻ trứng bao gồm tất cả các loài cá, bao gồm, nhưng không giới hạn, cá hồi, cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi bạc ở Thái Bình Dương, cá hồi to ở bắc Thái Bình Dương, cá hồi trắng, cá hồi đỏ, cá hồi gù, cá hồi masu ở Tây Thái Bình Dương, cá hồi, cá hồi đốm, cá hồi suối, cá hồi nâu, cá hồi nước ngọt phổ biến, cá hồi nước ngọt Bắc cực, cá hồi chấm hồng Bắc Cực, cá vược, cá vược lai, cá vược sọc, cá vược trắng, cá lai vược sọc và vược trắng, cá vược vàng, cá rô, cá rô trắng, cá rô vàng, cá

rô châu Âu, cá lai giữa rô và vược, cá rô phi Nile, cá rô phi xanh, cá lai giữa rô phi màu xanh và rô phi Nile, cá rô phi Mozambic, cá ngựa vằn, các loài cá chép, cá viền, cá tráp, cá mè, các loài cá da trơn và cá tuyết.

Các phương pháp theo sáng chế còn được áp dụng cho các động vật thủy sinh đẻ trứng như động vật giáp xác và/hoặc động vật thân mềm. Các động vật thủy sinh đẻ trứng này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn, tôm thẻ, tôm hồng, tôm hùm, tôm càng, cua, sò, mực, bạch tuộc, và những loài tương tự.

Như được định nghĩa ở đây, "triệt sản" các động vật thủy sinh đẻ trứng được hiểu có nghĩa là làm cho một cá thể không thể sinh sản qua giao phối. Các động vật thủy sinh đẻ trứng mất khả năng sinh sản được định nghĩa là các cá thể không thể đạt đến độ thành thục sinh dục hoặc sinh sản khi đến tuổi thành thục sinh dục.

Các phương pháp tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác mất khả năng sinh sản bao gồm việc đưa các hợp chất vào trứng của chúng trước khi thụ tinh hoặc kích hoạt nước để phá vỡ sự phát triển tế bào hoặc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH), và/hoặc sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC), sự di chuyển và thâm nhập vào trong các tuyến sinh dục của phôi thai, kết quả là tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc không thực hiện chức năng sinh dục đầy đủ và thích hợp ở cấp độ tế bào hoặc mô, và cuối cùng tạo ra cá và động vật thủy sinh khác đẻ trứng khác mất khả năng sinh sản.

Hoóc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH) là cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục và duy trì chu kỳ sinh sản ở động vật có xương. Cụ thể là, GnRH, còn được biết là hoóc-môn do vùng dưới đồi tiết ra (LHRH), kích thích sự tổng hợp và bài tiết của các gonadotrophin, đặc biệt là hoóc-môn kích thích nang trứng (FSH) và hoóc-môn thể vàng (LH), đều cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục và, do đó, sự phá vỡ quá trình tổng hợp và bài tiết GnRH là một phương pháp hiệu quả để gây ra vô sinh.

Các tế bào mầm nguyên (PGC) là một tập hợp tế bào trong phôi thai cá là tiền thân của các giao tử của cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác. Các tế bào mầm nguyên (PGC) được sinh ra trong giai đoạn đầu phát triển của phôi thai. Ở các giai đoạn sau của sự phát triển của phôi thai, các tế bào mầm nguyên (PGC) di chuyển xuyên qua các phôi từ vị trí ban đầu đến vùng tiền sinh dục. Khi kết thúc việc di chuyển của chúng, các tế bào mầm nguyên (PGC) thâm nhập các tuyến sinh dục phát triển, cư trú ở các mô

và bắt đầu quá trình giao tử, dẫn đến tuyến sinh dục phát triển thành thực ở cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác.

Các phương pháp theo sáng chế cho phép tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng mất khả năng sinh sản. Việc triệt sản này sẽ đặc biệt phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục ở các cá thể mà không ảnh hưởng bất lợi đến bất kỳ đặc điểm khác kết quả là tạo ra các động vật thủy sinh đẻ trứng hoàn toàn bình thường nhưng mất khả năng sinh sản.

Fig.1 là biểu đồ của phương pháp ngâm theo các phương án của sáng chế. Như đã trình bày, các hợp chất này được đưa vào trứng bằng cách ngâm trứng chưa thụ tinh (hoặc trứng trước kích hoạt nước) hoặc trứng đã thụ tinh trong các hợp chất mong muốn trong một môi trường ngâm nhúng. Thông thường, trứng được ngâm trong hợp chất khoảng 2 giờ đến khoảng 96 giờ hoặc nhiều hơn tùy thuộc vào loài và nhiệt độ ngâm. Việc đưa các hợp chất tốt nhất diễn ra trong khi màng đệm của trứng vẫn có thể thẩm thấu. Việc xử lý với các hợp chất mong muốn sẽ làm cho phôi giai đoạn sớm có thể phá vỡ sự phát triển hoóc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH) hoặc sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC). Khi trứng được xử lý bằng quá trình ngâm, cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác thu được sẽ mất khả năng sinh sản hoặc vô sinh, thường là không phát triển mạnh tuyến sinh dục.

Như vậy, theo các phương án khác nhau, sáng chế bộc lộ một phương pháp để đưa các hợp chất một cách hiệu quả vào phôi thai bằng cách cho trứng tiếp xúc với các hợp chất trước khi thụ tinh hoặc kích hoạt nước. Các hợp chất được lựa chọn sẽ phá vỡ sự phát triển của tế bào hoóc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH) và/hoặc sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC), sự di chuyển và/hoặc sự tồn tại với số lượng lớn phôi, dẫn đến tạo ra hàng loạt cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác mất khả năng sinh sản. Các phương pháp theo sáng chế cũng được áp dụng cho các phôi đơn lẻ trong việc tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác bị mất khả năng sinh sản ở quy mô nhỏ hơn.

Các hợp chất để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm các hợp chất đã biết dùng để phá vỡ sự phát triển của tế bào hoóc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH) và/hoặc sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC), sự di chuyển và/hoặc tồn tại có khả năng xâm nhập vào màng đệm của trứng trước khi thụ tinh hoặc trước khi kích hoạt nước. Theo một khía cạnh, các hợp chất đó có thể là một oligome Morpholino đối nghĩa

có khả năng phá vỡ sự phát triển của tế bào hoóc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH) và/hoặc sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC) và có khả năng vượt qua các màng đệm trứng. Như vậy, oligome Morpholino đối nghĩa tỏ ra hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế là oligome Morpholino hiệu quả trong việc truyền gen cho trứng và làm cho cá thể được tạo ra bị vô sinh.

Oligome Morpholino đối nghĩa được sử dụng để chặn tạm thời sự biểu hiện gen bằng cách hoặc là chặn việc dịch mã hoặc tách intron khỏi ARN, đó là một bước cần thiết để tạo ra mRNA. Oligome Morpholino có thể được xác định để chặn hoặc ức chế tạm thời sự biểu hiện của gen mà rất cần thiết cho sự phát triển tế bào mầm phôi thai bao gồm nhưng không giới hạn dnd, nanos, vasa, GnRH hoặc thể nhận FSH mà kết quả là tuyển sinh dục không phát triển và cuối cùng là tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác mất khả năng sinh sản.

Như vậy, theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng mất khả năng sinh sản được đề cập bao gồm việc cho trứng chưa thụ tinh hoặc trứng đã thụ tinh hoặc trứng trước khi kích hoạt nước tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa mà hiệu quả để truyền gen cho trứng và làm cho cá thể được tạo ra từ đó bị mất khả năng sinh sản. Việc tiếp xúc bao gồm việc truyền gen qua màng đệm của trứng.

Theo khía cạnh này, sáng chế liên quan đến các phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng mất khả năng sinh sản bằng cách đưa các oligome Morpholino hiệu quả vào trứng để phá vỡ sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC) và sự di chuyển đến, và chiếm đóng tại, tuyển sinh dục của phôi thai, dẫn đến tuyển sinh dục không phát triển và/hoặc không thực hiện chức năng sinh dục một cách đầy đủ và hợp lý ở cấp độ tế bào hoặc mô, và cuối cùng là tạo ra cá mất khả năng sinh sản.

Deadend (dnd) là một thành phần chủ chốt đặc biệt thuộc sinh chất phôi và tế bào phôi rất cần thiết cho sự phát triển tế bào mầm ở một số loại cá nhất định. Gen dnd được biểu hiện cụ thể trong sinh chất mầm và tế bào mầm nguyên gốc. Bởi vì dnd được coi là cần thiết cho việc di chuyển bình thường và sự sống còn của tế bào mầm nguyên (PGC), phôi không có protein này sẽ phát triển để trở thành cá thể trưởng thành vô sinh.

Các phương pháp được bộc lộ hữu ích trong việc tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh cho ngành nuôi trồng thủy sản, ngành kinh doanh cá cảnh, và và

kiểm soát các loài xâm lấn. Theo một khía cạnh, các phương pháp bao gồm việc phá vỡ sự phát triển của tuyến sinh dục thông qua việc đưa oligome Morpholino đối nghĩa chống lại gen *dnd* mRNA (*dnd*-MO) hoặc các gen khác mà cần thiết để phát triển tuyến sinh dục bao gồm, nhưng không giới hạn, *nanos*, *vasa*, *GnRH* hoặc thụ thể FSH, vào trứng trước khi thụ tinh hoặc trứng trước khi kích hoạt. Các hoạt động của *dnd*-MO hoặc oligome Morpholino đối nghĩa khác chống lại các gen này mà cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển mạnh và tạo ra cá trưởng thành vô sinh.

Theo các phương án, *dnd*-MO có thể ức chế tạm thời sự biểu hiện của protein *dnd* cần thiết cho sự phát triển tế bào mầm phôi thai.

Sáng chế này cũng liên quan đến trình tự oligome Morpholino đặc hiệu để sử dụng trong phương pháp ức chế sự biểu hiện gen *dnd* ở cá.

Fig.2 là biểu đồ chu trình tạo ra cá mất khả năng sinh sản bằng cách đưa oligome Morpholino đặc hiệu chống lại các mRNA *dnd* của họ cá hồi, họ cá vược ôn đới hoặc cá nhiệt đới nước ngọt để phá vỡ sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC), dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển, và cuối cùng tạo ra cá bị vô sinh. Khi trứng không được xử lý với oligomer Morpholino, chúng có thể trở thành cá trưởng thành có khả năng sinh sản.

Như ở Fig. 2, trứng của họ cá hồi, họ cá vược ôn đới hoặc cá nhiệt đới nước ngọt hoặc các loài cá khác, có thể tiếp xúc với oligome Morpholino chống lại các gen *dnd* của các loài cá liên quan. Fig. 2 minh họa việc đưa oligome Morpholino đặc hiệu vào chống lại các gen *dnd* của họ cá hồi, họ cá vược ôn đới hoặc cá nhiệt đới nước ngọt. Ngoài ra, trứng có thể không được xử lý. Như đã trình bày, trong khi trứng chưa thụ tinh được tiếp xúc với oligome Morpholino, oligome ảnh hưởng đến việc ức chế hay chặn việc dịch mã protein *dnd*, dẫn đến phá vỡ sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC). Họ cá hồi, họ cá vược ôn đới hoặc họ cá nhiệt đới nước ngọt khi trưởng thành thì hậu quả là bị mất khả năng sinh sản, vì không có sự phát triển mạnh ở tuyến sinh dục. Khi sự phát triển bình thường ở tế bào mầm nguyên (PGC) được cho phép, cá sẽ có sự phát triển mạnh tuyến sinh dục bình thường và cá có thể được sử dụng như cá cá trưởng thành có khả năng sinh sản.

Như vậy, theo các phương án, oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của ít nhất một trong các gen *dnd* ở họ cá hồi, gen *dnd* họ cá vược

ôn đới hoặc gen dnd họ cá nhiệt đới nước ngọt.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến việc xác định trình tự cụ thể của oligome Morpholino có thể được sử dụng để ức chế tạm thời sự biểu hiện của gen đặc trưng mà cần thiết cho sự phát triển của tế bào phôi. Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến oligome Morpholino đối nghĩa đặc hiệu mà có thể ức chế tạm thời và hiệu quả việc dịch mã dnd, một protein cần thiết cho sự tồn tại của tế bào phôi, và cụ thể là phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục dẫn đến việc tạo ra cá vô sinh, ví dụ như họ cá hồi (cá hồi đỏ và cá hồi to), họ cá vược ôn đới (cá vược) và cá nhiệt đới nước ngọt (cá rô phi và cá cảnh nhiệt đới).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến oligome Morpholino cụ thể, 5'-CTG ACTTG A ACGCTCCTCC ATTATC-3' (SEQ ID NO: 1) và các biến thể của chúng, ví dụ, 5'-ACTTGAACGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 2), mà có thể ức chế tạm thời và hiệu quả sự biểu hiện của gen dnd ở họ cá hồi, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc tuyến sinh dục không thực hiện chức năng đầy đủ và thích hợp, và cuối cùng tạo ra cá hồi vô sinh. Theo đó, các phương pháp bộc lộ được áp dụng cho tất cả cá hồi, bao gồm, nhưng không giới hạn, cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi bạc ở Thái Bình Dương, cá hồi to ở bắc Thái Bình Dương, cá hồi trắng, cá hồi đỏ, cá hồi gù, cá hồi masu ở Tây Thái Bình Dương, cá hồi đốm, cá hồi suối, cá hồi nâu, cá hồi nước ngọt phổ biến, cá hồi nước ngọt Bắc cực, cá hồi chấm hồng Bắc Cực, trong số các loài khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến oligome Morpholino đặc hiệu, 5'-GGCTCTGCTTGCTCTCC ATC ATCTC-3' (SEQ ID NO: 3) và các biến thể của chúng mà có thể ức chế tạm thời và hiệu quả sự biểu hiện của gen dnd ở họ cá vược ôn đới, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc tuyến sinh dục không thực hiện chức năng đầy đủ và thích hợp, và cuối cùng tạo ra cá vược ôn đới vô sinh. Theo đó, các phương pháp bộc lộ được áp dụng cho tất cả họ cá vược ôn đới, bao gồm, nhưng không giới hạn, cá vược sọc, cá vược trắng, cá lai vược sọc và vược trắng, cá vược vàng, cá rô trắng, cá rô vàng, cá rô châu Âu, và cá lai vược và rô, trong số loài khác.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế liên quan đến oligome Morpholino đặc hiệu, 5'-CTGGCTTTGCGTGTTTCCATCGTC-3' (SEQ ID NO: 4) và các biến thể của chúng mà có thể ức chế tạm thời và hiệu quả sự biểu hiện của gen dnd ở họ cá nhiệt đới nước ngọt, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc tuyến sinh dục không thực hiện

chức năng đầy đủ và thích hợp, và cuối cùng tạo ra cá nhiệt đới nước ngọt vô sinh. Theo đó, các phương pháp bộc lộ được áp dụng cho tất cả họ cá nhiệt đới nước ngọt và cá rô phi, bao gồm, nhưng không giới hạn, cá rô phi Nile, cá rô phi xanh, cá lai giữa rô phi xanh và rô phi Nile, cá rô phi Mozambic, và các loài cá khác ăn được và làm cảnh và các giống lai của chúng.

Các oligome Morpholino có thể là các biến thể của các trình tự được liệt kê. Những biến thể này có thể bao gồm nhưng không giới hạn các axit nucleic biến đổi khác và các oligome Morpholino khác mà bao gồm toàn bộ hoặc một phần trình tự được liệt kê ở trên. Cụ thể là, bao gồm các oligome đối nghĩa mà bao gồm chủ yếu, hoặc bao gồm một hoặc nhiều SEQ ID NO: 1, 3 và 4. Cũng được bao gồm là các biến thể của các oligome đối nghĩa, bao gồm oligome biến thể có 80%, 85%, 90 %, 95%, 97%, 98%, hoặc 99% (bao gồm tất cả các số nguyên ở giữa) độ tương đồng chuỗi hoặc độ đồng nhất chuỗi với bất kỳ một trong số SEQ ID NO:1, 3 và 4, và/hoặc các biến thể khác với những trình tự này khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit, tốt nhất là các biến thể có hiệu quả trong việc làm mất khả năng sinh sản ở cá khi tiếp xúc với trứng cá. SEQ ID NO: 2 là một biến thể được ưu tiên của SEQ ID NO: 1.

Các biến thể có hiệu quả trong việc làm mất khả năng sinh sản ở cá khi tiếp xúc với trứng cá được sử dụng trong bối cảnh này được hiểu là sử dụng các biến thể trong các phương pháp được bộc lộ tại đây sẽ dẫn đến cá vô sinh. Theo các phương án, các biến thể sẽ ức chế hiệu quả các biểu hiện của gen *dnd* mong muốn.

Theo các phương án của các phương pháp theo sáng chế, trứng cá chưa thụ tinh (một hoặc nhiều trứng) được ngâm trong môi trường ngâm gồm một oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen *dnd* ở cá mong muốn. Nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa trong chậu ngâm cần phải ở mức đủ để cho phép oligome Morpholino đối nghĩa đi qua màng đệm của trứng cá, truyền gen một cách hiệu quả cho trứng. Theo các phương án, nồng độ như vậy thường là khoảng 1 đến 20, tốt hơn nữa là, khoảng 3 đến khoảng 15 μ M, và còn tốt hơn nữa, khoảng 5 đến khoảng 10 μ M.

Môi trường ngâm là môi trường chứa nước và còn có thể chứa thêm dịch trứng cá hoặc chất pha loãng thụ tinh có chứa muối, Tris (pH 7-9), Glyxin, và/hoặc 0-30% các chất ức chế huyết thanh và proteaza như aprotinin hoặc leupeptin.

Mặc dù thời gian cần thiết cho việc ngâm trứng chưa thụ tinh hoặc trứng đã thụ tinh trước khi kích hoạt nước mà dẫn đến việc làm mất khả năng sinh sản đạt yêu cầu ở cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác sẽ phụ thuộc vào các loài cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác, thông thường là cá hoặc trứng khác sẽ được ngâm trong các môi trường ngâm chứa oligome Morpholino trong khoảng từ 2 đến khoảng 96 giờ, tốt hơn trong khoảng 4 đến khoảng 72 giờ, và còn tốt hơn nữa từ khoảng 5 đến khoảng 48 giờ.

Sáng chế còn liên quan đến các phương pháp để tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh phục vụ cho ngành nuôi trồng thủy sản, thị trường cá cảnh, và kiểm soát các loài xâm lấn trong đó các phương pháp này bao gồm việc phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục thông qua việc đưa hợp chất phân tử tiếp hợp với nhân tố vận chuyển đến trứng hoặc phôi, bằng cách đó các hợp chất có thể truyền gen vào trứng, cụ thể là, tiếp cận và thâm nhập vào trứng chưa thụ tinh hoặc phôi. Các hoạt động của các hợp chất bên trong trứng hoặc phôi làm cho tuyến sinh dục không thể phát triển mạnh và cuối cùng tạo ra cá và các động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác vô sinh. Nhân tố vận chuyển phân tử có thể vận chuyển một cách hiệu quả các hợp chất tiếp hợp với nó thông qua các kênh và lỗ rất nhỏ, do đó cho phép hóa chất, thuốc, peptit v.v đi qua các màng đệm và thâm nhập vào trứng hoặc phôi và đi đến mô đích. Như vậy, thông qua các phương pháp này, trứng, chưa thụ tinh hoặc đã thụ tinh, có thể tiếp xúc hiệu quả với oligome Morpholino (hoặc các hợp chất có lợi sinh học khác) để tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh.

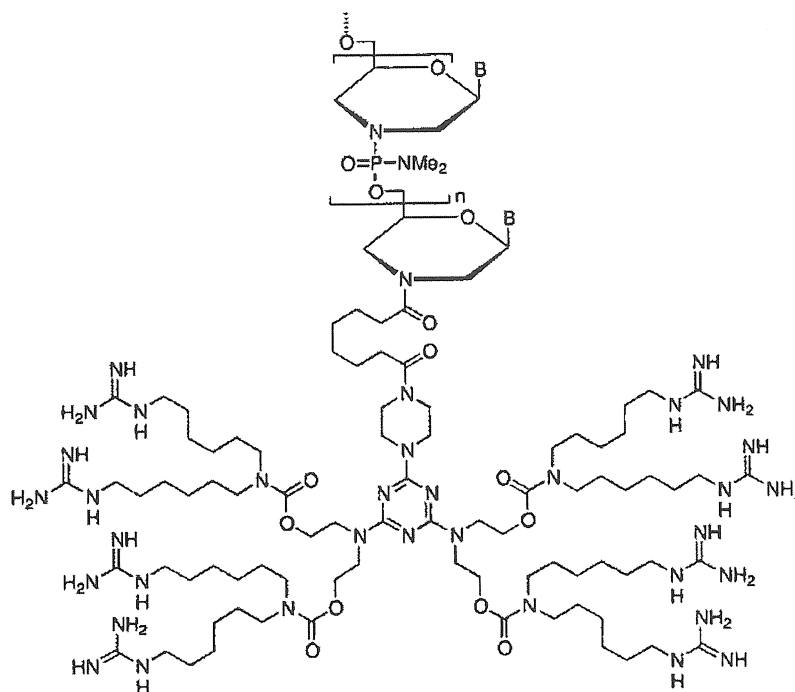
Theo một khía cạnh, sáng chế liên quan đến phương pháp tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh bằng cách đưa các hợp chất phân tử tiếp hợp với nhân tố vận chuyển đến trứng hoặc phôi cá chưa thụ tinh để phá vỡ sự phát triển của tế bào hoóc-môn tiết ra gonadotrophin (GnRH) và/hoặc sự phát triển tế bào mầm nguyên (PGC), và sự di chuyển đến và chiếm đóng tại tuyến sinh dục của phôi, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc không thực hiện chức năng sinh dục một cách đầy đủ và hợp lí ở cấp độ tế bào hoặc mô, và cuối cùng là tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh.

Nhân tố vận chuyển phân tử có thể được bất kỳ hợp chất có khả năng tiếp hợp một oligome Morpholino để vận chuyển oligome Morpholino đến trứng hoặc phôi.

Theo một khía cạnh, sáng chế liên quan đến nhân tố vận chuyển phân tử gồm dendrime oligoguanidin với lõi triazin, ví dụ, của loại đã được mô tả ở bằng sáng chế Hoa

Kỳ số 7.935.816. Nhân tố vận chuyển phân tử này có thể là một dendrime octaguanidin với một lõi triazin, cũng được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật gọi là "Vivo". Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 7.935.816 được bộc lộ ở đây là nhằm mục đích tham khảo với toàn bộ nội dung tương ứng.

Một hợp chất vận chuyển dendrime octaguanidin được minh họa với morpholino như một chất hoạt tính sinh học đại diện được thể hiện trong các liên kết sau đây:



Một hợp chất vận chuyển tiền thân đặc biệt đó mà rất hữu ích với oligome morpholino theo sáng chế này là 2-[(4-nitrophenyl)oxycarbonyl]-hexametylenecarbonylpiperazinyl]-4,6-bis{di-[di(trifluoroacetamit)aminocarbonyl oxyethyl]amin}triazin.

Sáng chế cũng liên quan đến việc sử dụng dendrime octaguanidin với một lõi triazin như một nhân tố vận chuyển phân tử cho phép việc đi ngang bởi các phân tử hoạt động sinh học lớn hoặc các hợp chất có lợi sinh học tới màng đệm của trứng. Các nhân tố vận chuyển phân tử này hiệu quả cho việc vận chuyển qua màng đệm của một liên hợp của các hợp chất vận chuyển phân tử và oligome Morpholino.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, các phương pháp được đề cập để truyền

các hợp chất vào trứng từ động vật thủy sinh để trứng bao gồm việc cho trứng chưa thụ tinh hoặc trước khi kích hoạt nước tiếp xúc với ít nhất một hợp chất có lợi sinh học. Theo phương pháp này, trứng chưa thụ tinh hoặc trước khi kích hoạt nước là đủ thẩm thấu để hấp thụ hiệu quả ít nhất một hợp chất có lợi sinh học. Thuật ngữ "hấp thụ hiệu quả" được sử dụng ở đây có nghĩa là hợp chất có lợi sinh học sẽ hiệu quả đối với các tác dụng có lợi từ việc sử dụng chúng. Các hợp chất sinh học có lợi có thể được lựa chọn từ nhóm gồm các kháng thể, protein, peptit, ARN và ADN.

Theo các phương án, hợp chất có lợi sinh học sẽ được đề xuất như một liên hợp của hợp chất có lợi sinh học và hợp chất vận chuyển phân tử chứa một dendrime octaguanidin gồm một nửa lõi triazin. Theo những phương án này, các hợp chất vận chuyển phân tử hiệu quả cho việc vận chuyển màng đệm của hợp chất có lợi sinh học sao cho việc tiếp xúc bao gồm việc truyền gen cho trứng qua màng đệm. Hợp chất có lợi sinh học, theo các phương án đề xuất hợp chất ở dạng liên hợp, là một hợp chất mà có thể tạo thành một liên hợp với hợp chất vận chuyển phân tử chứa một dendrime octaguanidin gồm một nửa lõi triazin. Hợp chất có lợi sinh học có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm các kháng thể, protein, peptit, ARN và ADN.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh, phương pháp này gồm việc cho trứng chưa thụ tinh hoặc đã thụ tinh trước khi kích hoạt nước tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa mà hiệu quả để truyền gen cho trứng và làm cho cá thể được tạo ra từ đó vô sinh, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa được tiếp hợp với một hợp chất phân tử vận chuyển hiệu quả để vận chuyển qua màng đệm của liên hợp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh, phương pháp này gồm việc cho trứng (hay phôi) đã thụ tinh tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa liên hợp với với hợp chất vận chuyển phân tử hiệu quả để truyền gen cho trứng và làm cho các cá thể được tạo ra từ đó vô sinh.

Các oligome được lựa chọn có thể phá vỡ sự phát triển tế bào GnRH và/hoặc PGC, sự di chuyển và/hoặc sự tồn tại với số lượng lớn phôi, dẫn đến việc tạo ra với quy mô lớn cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác trưởng thành vô sinh. Các phương pháp theo sáng chế cũng được áp dụng cho các phôi đơn lẻ trong việc tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác trưởng thành vô sinh ở quy mô nhỏ hơn.

Theo các phương án thực hiện, phương pháp bao gồm việc chuẩn bị và sử dụng một nhân tố vận chuyển phân tử được liên hợp với oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của *dnd*, *nanos* hoặc *vasa* ở các loài cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác. Theo các phương án khác, oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của ít nhất một trong những gen *dnd* ở họ cá hồi, gen *dnd* ở họ cá vược ôn đới hoặc gen *dnd* ở họ cá nhiệt đới nước ngọt. Theo những phương án khác, oligome Morpholino đối nghĩa là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc các biến thể của chúng có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen *dnd* ở các loài cá.

Theo một phương án, phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh được đề xuất, bao gồm ngâm trứng chưa thụ tinh hoặc đã thụ tinh vào trong một môi trường ngâm gồm một liên hợp của hợp chất vận chuyển phân tử và oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen *dnd* hoặc các gen khác như *nanos*, *vasa*, *GnRH* hoặc thụ thể *FSH* là rất cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở cá và các loài thủy sinh đẻ trứng khác. Tốt hơn là, nhân tố vận chuyển phân tử là một dendrime octaguanidin với một lõi triazin.

Theo các khía cạnh cụ thể của phương pháp theo sáng chế, trứng chưa thụ tinh hoặc trước kích hoạt nước (một hoặc nhiều trứng) được ngâm trong một môi trường nước gồm oligome Morpholino đối nghĩa hoặc thể liên hợp giữa oligome Morpholino đối nghĩa và nhân tố vận chuyển có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen *dnd* hoặc các gen khác rất cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở cá và các loài thủy sinh đẻ trứng khác. Nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa trong môi trường ngâm cần phải đủ để cho phép thể liên hợp giữa oligome Morpholino đối nghĩa và nhân tố vận chuyển đi qua các màng đệm của trứng. Theo các phương án, nồng độ như vậy thường sẽ là khoảng 1 đến 20 μM , tốt hơn khoảng 3 đến khoảng 15 μM , thậm chí tốt hơn từ khoảng 5 đến khoảng 10 μM .

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh, phương pháp này gồm việc cho trứng đã thụ tinh tiếp xúc với oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với hợp chất vận chuyển phân tử có hiệu quả để truyền gen vào trứng đã thụ tinh và làm cho cá thể được tạo ra từ đó vô sinh. Việc tiếp xúc bao gồm việc truyền gen đến trứng qua màng đệm của trứng.

Theo các phương án của phương pháp này, trứng (phôi) đã thụ tinh được xử lý bằng cách ngâm trong môi trường ngâm chứa thể liên hợp giữa oligome Morpholino đối nghĩa và nhân tố vận chuyển có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen dnd hoặc các gen khác rất cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở cá và các loài thủy sinh trứng đẻ trứng mong muốn khác. Nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa trong môi trường ngâm cần phải đủ để cho phép thể liên hợp giữa oligome Morpholino đối nghĩa và nhân tố vận chuyển đi qua các màng đệm của trứng đã thụ tinh. Nồng độ như vậy sẽ cao hơn mức cần thiết để ngâm trứng chưa thụ tinh bởi vì, sau khi thụ tinh và nước kích hoạt, màng đệm trứng trở nên không thấm nước, cản trở việc đi vào trứng. Thông thường, nồng độ của bình ngâm phôi là khoảng 20 đến khoảng 80 μ M, tốt hơn là khoảng 40 đến khoảng 60 μ M.

Theo các phương án xử lý trứng đã thụ tinh, oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của ít nhất một trong những gen dnd ở họ cá hồi, gen dnd ở họ cá vược ôn đới hoặc gen dnd ở họ cá nhiệt đới nước ngọt. Theo các phương án khác nữa, oligome Morpholino đối nghĩa là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc một biến thể của nó có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen dnd ở cá và các loài thủy sinh đẻ trứng khác.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, một thành phần có hiệu quả cho việc phá vỡ sự di chuyển tế bào phôi gốc ở được đề cập, bao gồm một oligome Morpholino đối nghĩa được chọn từ SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 hoặc biến thể như SEQ ID NO: 2 của chúng có khả năng ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen dnd ở cá. Theo khía cạnh này, một thành phần để xử lý trứng cá để cá được tạo ra và từ đó trở nên vô sinh được đề cập, gồm một oligome Morpholino được lựa chọn từ nhóm gồm các oligome của SEQ ID NOS: 1-4 và các biến thể của nó có hiệu quả trong việc làm mất khả năng sinh sản ở cá khi tiếp xúc với trứng cá. Thành phần oligome Morpholino này tốt nhất được sử dụng trong việc xử lý trứng cá chưa thụ tinh.

Sáng chế còn liên quan đến một thực thể hợp chất mới có khả năng đặc biệt phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục dẫn đến tạo ra cá vô sinh. Thực thể hợp chất mới bao gồm nhân tố vận chuyển phân tử dendrime octaguanidin được liên hợp với oligome Morpholino đối nghĩa ức chế hiệu quả sự dịch mã của gen dnd, một protein cần thiết cho sự tồn tại của tế bào phôi, mRNA. Liên hợp này có thể được sử dụng để xử lý trứng chưa

thụ tinh hoặc trước khi kích hoạt nước hoặc để xử lý trứng đã thụ tinh.

Hợp chất liên hợp này có thể được sử dụng cho việc tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh. Các hợp chất oligome Morpholino có thể được liên hợp với nhân tố vận chuyển để đi xuyên vào màng đệm một cách hiệu quả và thâm nhập vào phôi. Do đó, các hợp chất có khả năng đặc hiệu phá vỡ sự phát triển tuyến sinh dục tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác vô sinh. Tốt hơn nữa là, nhân tố vận chuyển phân tử gồm một dendrime octaguanidin với một lõi triazin và oligome gồm một oligome Morpholino đối nghĩa được chọn từ SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4 hoặc bất kỳ của các biến thể khác nhau có hiệu quả trong việc làm mất khả năng sinh sản ở cá khi cho tiếp xúc với trứng cá, chẳng hạn như SEQ ID NO: 2.

Cần phải công nhận rằng việc cho trứng và/hoặc phôi tiếp xúc với các hợp chất, thể liên hợp, và chế phẩm theo sáng chế này có thể được thực hiện bằng bất cứ cách nào phù hợp, ví dụ, bao gồm ngâm tiếp xúc, hoặc cách khác tiếp xúc không liên quan đến việc ngâm, mặc dù phải công nhận rằng việc ngâm tiếp xúc cung cấp một kỹ thuật tiếp xúc hiệu quả và đầy đủ phù hợp với hoạt động quy mô lớn để tạo ra cá và động vật thủy sinh vô sinh. Kỹ thuật tiếp xúc không ngâm có thể được sử dụng trong việc thực hành rộng rãi của sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở phương pháp phun hoặc phương pháp nhỏ giọt để tiếp xúc, kỹ thuật chuyển giao khô, trong đó trứng được tiếp xúc với một chất mang hoặc bề mặt được phủ với hoặc nếu không thì hỗ trợ bất kỳ hợp chất, thể liên hợp, hoặc chế phẩm theo sáng chế này hiệu quả trong việc tạo ra cá vô sinh, hoặc các kỹ thuật khác, nhờ đó trứng và/hoặc phôi được tiếp xúc với các hợp chất, thể liên hợp, và/hoặc các chế phẩm theo sáng chế này. Việc tiếp xúc tốt hơn là bao gồm việc tiếp xúc không qua đường tiêm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Những lợi thế và đặc trưng của sáng chế này còn được minh họa rõ hơn với tham chiếu các ví dụ sau đây, là không được hiểu là theo bất kỳ cách nào giới hạn phạm vi của sáng chế nhưng chính xác hơn là minh họa của phương án thực hiện cụ thể của sáng chế trong các ứng dụng cụ thể của chúng.

Ví dụ 1:

Cá ngựa vằn được lựa chọn để cho thí dụ minh họa ban đầu của các phương pháp

theo sáng chế, do thời gian tạo ra chúng ngắn và một số lượng lớn phôi được tạo ra cho mỗi lần giao phối, mà có thể dễ dàng thu được hàng ngày hoặc hàng tuần. Ngoài ra, các phôi của cá ngựa vằn trong suốt, làm cho dễ dàng quan sát bằng mắt, và khỏe mạnh. Sự phát triển bình thường của tế bào GnRH, PGCs và tuyến sinh dục trong phôi thai là một cơ chế tiến hóa được bảo tồn mà được tìm thấy trong tất cả các loài cá. Theo đó, các phương pháp theo sáng chế được áp dụng cho tất cả các loài cá, bao gồm, nhưng không giới hạn, cá ngựa vằn, loài cá chép, loài cá hồi lớn, các loài cá hồi khác, cá viên (bao gồm cá tráp và cá mùi), cá vược (bao gồm cá mú biển và cá mú nước ngọt và cá lai giữa hai loại, vv), cá rô (cá rô vàng, cá rô trắng, vv), các loài cá da trơn, cá tuyết và các nhóm loài cơ bản khác là ứng viên cho ngành nuôi trồng đánh bắt.

Vivo và dnd-MO

Một nhân tố vận chuyển phân tử, một octaguanidin dendrime với một lõi triazin cũng được biết đến như là Vivo, được liên hợp với dnd-MO ở cá ngựa vằn, 5'-GCTGGGCATCCATGTCTCCGACCAT-3' (SEQ ID NO.5) (zfdnd-MO-Vivo) và được sử dụng trong một môi trường ngâm chứa phôi cá ngựa vằn trong nước. Sau lần ngâm trong 3 tiếng với 20 μ M zfdnd-MO-Vivo, chất kết tụ không đặc tính thu được xung quanh phần bên trong của màng đệm hoặc bề mặt của đĩa phôi (FIG.3A). Nhiều chất kết tụ hơn xuất hiện sau 5 giờ ngâm (FIG.3B). Chất kết tụ không được tìm thấy trong nhóm kiểm soát không liên hợp được ngâm với 20 μ M zfdnd-MO cho 3 hoặc 5 giờ (FIG.3C)/(FIG.3D). Kết quả cho thấy sự tiếp hợp của oligome Morpholino đối nghĩa với Vivo tạo ra khả năng của các hợp chất liên hợp để hoạt động trên màng đệm tạo ra chất kết tụ.

Vào 2 ngày sau khi thụ tinh, thử nghiệm kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang cho thấy rằng các tế bào mầm trong phôi được ngâm với 40 hoặc 60 μ M zfdnd-MO-Vivo di chuyển nhằm hướng và phân hóa thành các loại tế bào khác (như FIG.4A., FIG.4B). Như đã trình bày, dnd-MO-Vivo ở cá ngựa vằn phá vỡ sự phát triển tế bào mầm ở cá ngựa vằn. FIG.4A cho thấy ở cá kiểm soát, các tế bào mầm đã di chuyển tới vùng cơ quan sinh dục và duy trì hình thái học của chúng (các tế bào hình dạng tròn). FIG.4B cho thấy việc xử lý bằng zfdnd-MO-Vivo làm cho tế bào mầm di chuyển nhằm hướng và cuối cùng phân hóa thành loại tế bào khác.

Ví dụ 2:

Cá ngựa vằn được xử lý trong Ví dụ 1 đã được kiểm tra sau khi phát triển thành cá trưởng thành. Việc ngâm phôi cá ngựa vằn trong môi trường với 40 hoặc 60 μ M zfdnd-MO-vivo cho phép tạo ra hiệu quả vô sinh là 100% ở các cá thể đã được xử lý trong điều kiện tối ưu như thể hiện ở Fig.8, mà không ảnh hưởng đến bất kỳ đặc điểm sinh lý khác của cá (Fig.5). Như thể hiện ở Fig.5, phôi được xử lý bằng dnd-MO-Vivo ở cá ngựa vằn phát triển thành cá đực trưởng thành vô sinh. Fig.5A cho thấy không có sự khác biệt về ngoại hình hoặc kích thước tổng thể quan sát được giữa cá trưởng thành được xử lý và cá đực hoang dã. Fig.5B cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về trọng lượng cơ thể ở cá 3 tháng tuổi ($n = 12$ bằng cách lấy mẫu ngẫu nhiên) trong số các cá được xử lý với zfdnd-MO-Vivo, và cá đực hoang dã không được xử lý.

Trong các thí nghiệm khác, các phương pháp theo sáng chế đã được áp dụng thành công ở cá ngựa vằn và thời gian ngâm được giảm xuống còn 5-6 giờ mà không ảnh hưởng đến hiệu quả vô sinh (Fig. 6 Fig. 7, và Fig. 8). Theo Fig. 6, zfdnd-MO-Vivo gây ra vô sinh ở cá ngựa vằn được hiển thị. Việc kiểm tra mô tuyến sinh dục cho thấy (A) một tinh hoàn phát triển tốt của cá đực không được xử lý. (B) một buồng trứng phát triển tốt của cá cái không được xử lý. (C) Các tuyến sinh dục của cá được xử lý với zfdnd-MO-Vivo phát triển thành một mô dạng sợi mỏng. Hình ảnh kính hiển vi (D-F) cho thấy (D) hoạt động sinh tinh của tinh hoàn ở cá đực không được xử lý. (E) Một buồng trứng phát triển tốt của một cá cái không được xử lý với tế bào trứng ở các giai đoạn phát triển khác nhau. (F) các tuyến sinh dục của cá được xử lý dường như kém phát triển và được bao quanh với một số lượng lớn các tế bào mỡ không có cấu trúc cơ quan sinh dục hoặc các tế bào gốc phát triển.

Như theo FIG.7 và FIG.8, phôi cá ngựa vằn xử lý được xử lý với dnd-MO-Vivo phát triển thành cá trưởng thành vô sinh. Ở cả hai loại ngâm A) 24 giờ và B) 5-6 giờ, tất cả các phôi mà ban đầu được ngâm trong 60 hoặc 40 μ M zfdnd-MO-Vivo ngay lập tức sau khi thụ tinh phát triển thành cá trưởng thành vô sinh.

Ví dụ 3:

Để tiếp tục tối ưu hóa công nghệ, việc ngâm được tiến hành khi sử dụng trứng chưa thụ tinh bởi vì độ thẩm thấu của màng đệm giảm dần sau khi thụ tinh và kích hoạt nước. Kết quả cho thấy khi trứng được ngâm với 40 μ M zfdnd-MO (dnd-MO-Flu) được dán nhãn huỳnh quang, trứng chưa thụ tinh hấp thụ nhiều dnd-MO-Flu hơn so với trứng

được kích hoạt nước 1 giờ trước khi ngâm (Fig.9). Như thể hiện ở Fig. 9, trứng có độ thâm thấu hơn trước khi kích hoạt nước. Trong lần ngâm 5 giờ với 40 μ M zfdnd-MO-Flu, A) trứng chưa thụ tinh (huỳnh quang xanh lá cây mạnh hơn) hấp thụ nhiều zfdnd-MO-Flu hơn B) trứng trước kích hoạt nước.

Ví dụ 4:

Khi trứng họ cá hồi (cá hồi to) trước khi thụ tinh được ngâm với dnd-MO + DND-MO-Vivo (Ssdnd-MO + Ssdnd-MO-Vivo) của họ cá hồi, các tế bào phôi bị loại bỏ (FIG.10) cho thấy do sự thiếu biểu hiện của chất đánh dấu đặc trưng tế bào phôi - gen vasa. Như thể hiện trong Fig. 10, trứng họ cá hồi (trout) được ngâm với dnd-MO của họ cá hồi tại A: Cá thể bình thường; B: 10 μ M Ssdnd-MO; C: 10 μ M Ssdnd-MO + 1 μ M Ssdnd-MO-Vivo; D:10 μ M Ssdnd-MO + 2 μ M Ssdnd-MO-Vivo trong 48 giờ trước khi thụ tinh. Ngay sau khi trứng nở, phần giữa của cơ thể đã được cắt ra và được sử dụng để chiết xuất ARN và RT-PCR để phát hiện các biểu hiện gen vasa. Một con cá từ nhóm C và một con từ nhóm D dường như có biểu hiện gen vasa rất thấp, cho thấy tác dụng tốt trong việc giảm sự dư thừa của tế bào phôi. RT: có nghĩa là sao chép ngược.

Như đã mô tả trong tài liệu này, các phương pháp này được áp dụng chung cho cá và động vật thủy sinh để trứng được nuôi trồng, bởi vì người ta mong muốn tạo ra các loài cá nuôi trồng vô sinh. Theo đó, các phương pháp của sáng chế được áp dụng cho bất kỳ loài cá và các loài thủy sản để trứng được nuôi trồng, đặc biệt là đối với các loài nuôi trồng có tính thương mại quan trọng.

Trong khi sáng chế được viết ra ở đây có tham khảo đến các lĩnh vực, tính năng và phương án minh họa cụ thể, sẽ được đánh giá cao rằng việc sử dụng sáng chế do vậy không bị hạn chế, mà nhưng thay vào đó mở rộng và bao gồm nhiều biến thể, sửa đổi và phương án thay thế khác, bởi vì sẽ là gợi ý cho những người có những kỹ năng trung bình trong lĩnh vực sáng chế đề cập, dựa trên phần mô tả trong tài liệu này. Do đó, sáng chế như được yêu cầu bảo hộ sẽ được hiểu và giải thích một cách rộng rãi, như bao gồm tất cả các biến thể, thay đổi và phương án thay thế như vậy, trong tinh thần và phạm vi của chúng.

Các phương pháp và các hợp chất theo sáng chế tạo ra cá và động vật thủy sinh để trứng vô sinh. Sự triệt sản (làm mất khả năng sinh sản) ở cá và động vật thủy sinh để trứng

được nuôi trồng làm tăng tốc độ tăng trưởng bằng cách tăng chuyển hóa năng lượng thức ăn để tăng trưởng cơ bắp, thay vì phát triển tuyến sinh dục. Ngoài ra, nếu thoát khỏi môi trường nuôi trồng thủy sản ra môi trường bên ngoài, cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi trồng, bao gồm các loài thuần dưỡng, không phải loài bản địa hoặc biến đổi gen, sẽ không thể sinh sản hoặc phối giống với các loài hoang dã. Điều này sẽ hỗ trợ ngăn chặn sinh học và phòng ngừa ô nhiễm di truyền của quần thể hoang dã và/hoặc hình thành trong tự nhiên các loài cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi trồng thuần dưỡng, không phải bản địa hoặc biến đổi gen.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra cá không có khả năng sinh sản, phương pháp này bao gồm bước ngâm trong môi trường ngâm (các) trứng chưa được thụ tinh hoặc (các) trứng đã được thụ tinh đã được hoạt hóa trước với nước với oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với hợp chất vận chuyển phân tử bao gồm octaguanidin dendrime chứa phân lõi triazin hữu hiệu để chuyển nhiễm (các) trứng và khiến cho (các) cá thể được tạo ra từ nó là không có khả năng sinh sản.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ức chế sự biểu hiện của gen cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở cá.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ức chế sự biểu hiện của gen thụ thể dead end, nanos, vasa, gnrh hoặc fsh ở cá.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước ngâm tác động đến sự chuyển nhiễm qua màng đệm của (các) trứng.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome được chọn từ nhóm gồm các oligome có trình tự SEQ ID NO: 1-4 và các biến thể của chúng mà hữu hiệu trong việc làm mất khả năng sinh sản ở cá bằng cách cho tiếp xúc với (các) trứng cá.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó (các) trứng chưa được thụ tinh hoặc các trứng đã được thụ tinh đã được hoạt hóa trước với nước bao gồm (các) trứng cá được chọn từ nhóm gồm họ cá hồi, họ cá vược ôn đới và họ cá nhiệt đới nước ngọt.
7. Phương pháp tạo ra cá không có khả năng sinh sản, phương pháp này bao gồm bước ngâm trong môi trường ngâm (các) trứng đã được thụ tinh với oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với hợp chất vận chuyển phân tử bao gồm octaguanidin dendrime chứa gốc lõi triazin hữu hiệu để chuyển nhiễm (các) trứng đã thụ tinh và khiến cho các cá thể được tạo ra từ chúng không có khả năng sinh sản.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ức chế sự biểu hiện của gen cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở cá.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ức chế sự biểu

hiện của gen thụ thể dead end, nanos, vasa, gnrh hoặc fsh ở cá.

10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước ngâm đã nêu tác động đến sự chuyển nhiễm qua màng đệm của (các) trứng.

11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome được chọn từ nhóm gồm oligomer có trình tự SEQ ID NO: 1-4 và các biến thể của chúng mà hữu hiệu trong việc làm mất khả năng sinh sản của cá khi tiếp xúc với (các) trứng cá này.

12. Phương pháp theo điểm 3, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ức chế sự biểu hiện của gen dead end.

13. Phương pháp theo điểm 9, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ức chế sự biểu hiện của gen dead end.

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó gen dead end đã nêu bao gồm ít nhất một trong số các gen dead end ở họ cá hồi, họ cá vược ôn đới và họ cá nhiệt đới nước ngọt.

15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó gen dead end đã nêu bao gồm ít nhất một trong số các gen dead end ở họ cá hồi, họ cá vược ôn đới và họ cá nhiệt đới nước ngọt.

16. Phương pháp theo điểm 3, trong đó hợp chất vận chuyển phân tử bao gồm 2-[(4-nitrophenyl)oxycarbonylhexametylenecarbonylpiperazinyl]-4,6-bis{di[di(trifloaxetamido-hexyl)-aminocarbonyloxyetyl]amino}triazin.

17. Phương pháp theo điểm 7, trong đó hợp chất vận chuyển phân tử bao gồm 2-[(4-nitrophenyl)oxycarbonylhexametylenecarbonylpiperazinyl]-4,6-bis{di[di(trifloaxetamido-hexyl)-aminocarbonyloxyetyl]amino}triazin.

18. Phương pháp theo điểm 5, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 1.

19. Phương pháp theo điểm 5, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 2.

20. Phương pháp theo điểm 5, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 3.

21. Phương pháp theo điểm 5, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 4.
22. Phương pháp theo điểm 11, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 1.
23. Phương pháp theo điểm 11, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 2.
24. Phương pháp theo điểm 11, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 3.
25. Phương pháp theo điểm 11, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 4.
26. Chế phẩm dùng để xử lý trứng cá khiến cho cá được tạo ra từ đó không có khả năng sinh sản, chế phẩm này bao gồm oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với chất vận chuyển phân tử octaguanidin dendrime, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa đã nêu ức chế sự dịch mã gen dead end ở cá đã nêu.
27. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa đã nêu bao gồm oligome được chọn từ nhóm gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 1-4 và các biến thể của chúng.
28. Chế phẩm theo điểm 26, bao gồm môi trường nước chứa oligome Morpholino đối nghĩa.
29. Chế phẩm theo điểm 26 trong đó trứng cá chưa được thụ tinh hoặc trứng cá đã được thụ tinh được hoạt hóa trước với nước.
30. Chế phẩm theo điểm 29, trong đó nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa nằm trong khoảng từ 1 đến 20 μM .
31. Chế phẩm theo điểm 29, trong đó nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa nằm trong khoảng từ 3 đến 15 μM .
32. Chế phẩm theo điểm 29, trong đó nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa nằm trong khoảng từ 5 đến 10 μM .

33. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó trứng cá là trứng cá đã được thụ tinh.
34. Chế phẩm theo điểm 33, trong đó nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa nằm trong khoảng từ 20 đến 80 μM .
35. Chế phẩm theo điểm 33, trong đó nồng độ của oligome Morpholino đối nghĩa nằm trong khoảng từ 40 đến 60 μM .
36. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với 2-[(4-nitrophenyl)oxycarbonylhexametylenecarbonylpiperazinyl]-4,6-bis {di [di(triflo-axetamidohexyl)-aminocarbonyloxyetyl]amino} triazin.
37. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome được chọn từ nhóm gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 1-4.
38. Chế phẩm theo điểm 37, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 1.
39. Chế phẩm theo điểm 37, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 2.
40. Chế phẩm theo điểm 37, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 3.
41. Chế phẩm theo điểm 37, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm oligome có trình tự SEQ ID NO: 4.
42. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa là SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc biến thể của nó.
43. Chế phẩm theo điểm 42, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa là SEQ ID NO: 1 hoặc biến thể của nó.
44. Chế phẩm theo điểm 42, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa is SEQ ID NO: 2 hoặc biến thể của nó.
45. Chế phẩm theo điểm 42, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa is SEQ ID NO: 3 hoặc biến thể của nó.
46. Chế phẩm theo điểm 42, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa is SEQ ID NO:

4 hoặc biến thể của nó.

47. Chế phẩm theo điểm 26, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với chất vận chuyển phân tử octaguanidin dendrime là hữu hiệu trong việc làm mất khả năng sinh sản của trứng cá đã nêu bằng cách ngâm trứng cá trong môi trường ngâm chứa lượng hữu hiệu của oligome Morpholino đối nghĩa được liên hợp với chất vận chuyển phân tử octaguanidin dendrime.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UNIVERSITY OF MARYLAND BALTIMORE COUNTY

<120> Phương pháp tạo ra cá không có khả năng sinh sản và chế phẩm dùng để xử lý trứng cá

<130> 4451-267-PCT

<140> Chưa xác định

<141> 2014-11-14

<150> US 61/904,652

<151> 2013-11-15

<150> US 61/968,458

<151> 2014-03-21

<150> US 62/050,815

<151> 2014-09-16

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 1
ctgacttgaa cgctcctcca ttatc 25

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 2
acttgaacgc tcctccat 18

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Morone saxatilis

<400> 3
ggctctgctt gctctccatc atctc 25

<210> 4

<211> 25

<212> ADN

<213> Oreochromi niloticus

<400> 4
ctggctttgc gtgttttcca tcgtc 25

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> Danio rerio

<400> 5
gctgggcatc catgtctccg accat 25

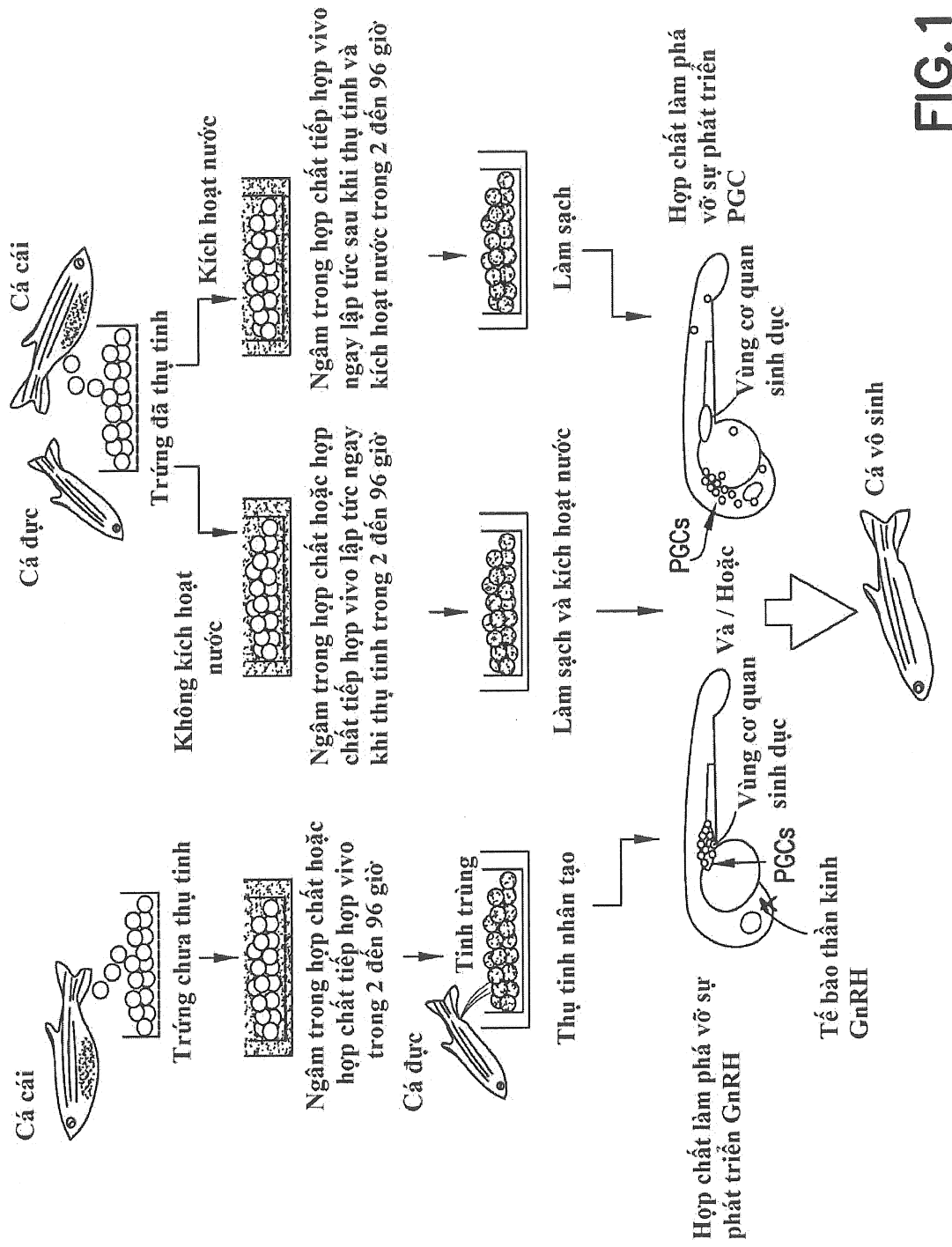


FIG.1

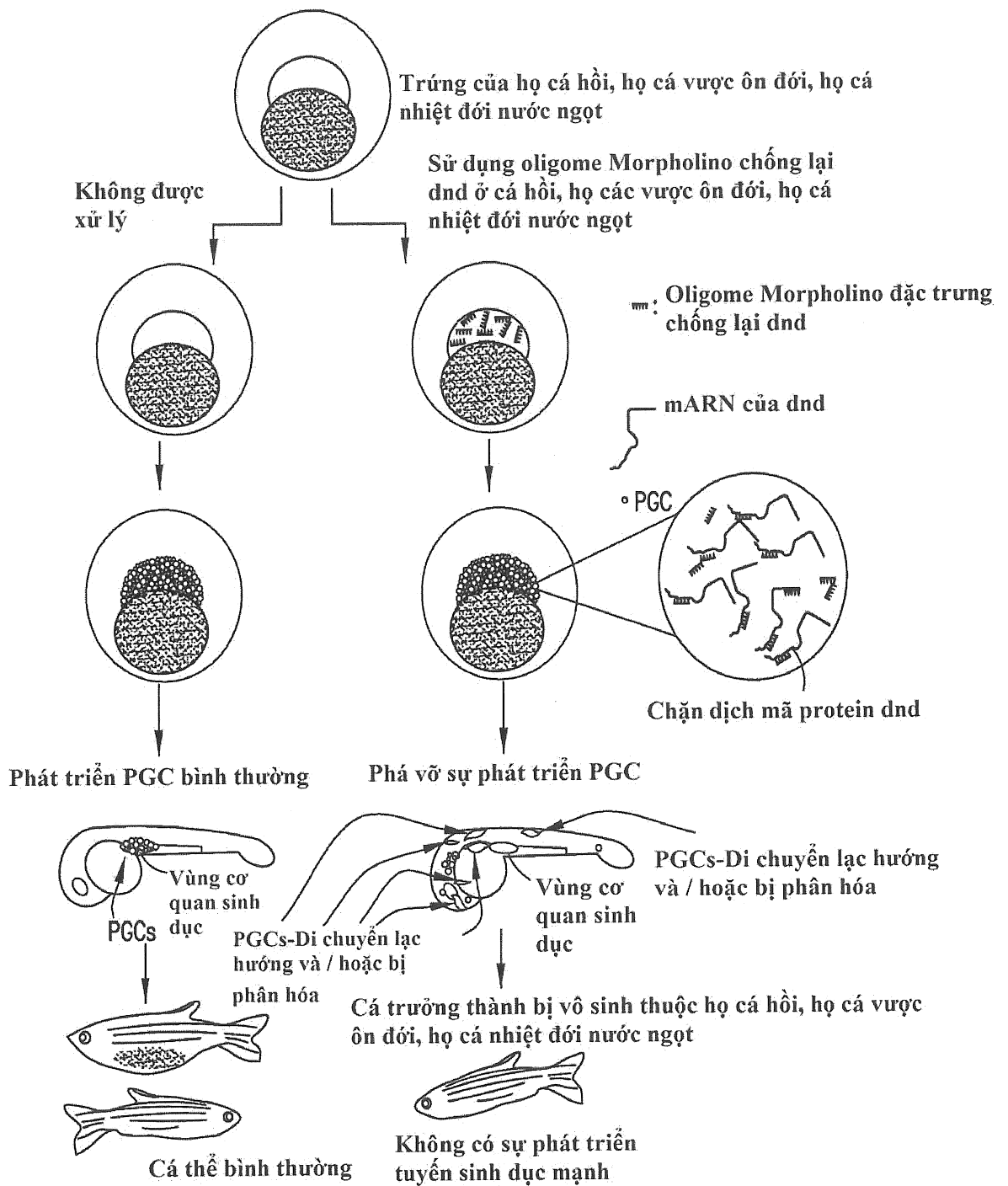


FIG.2

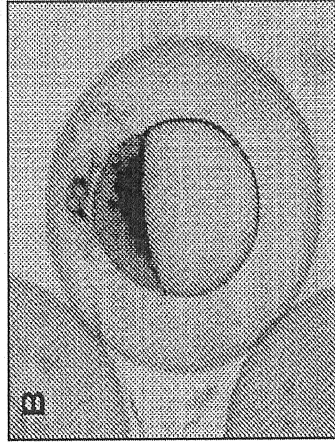


FIG. 3B

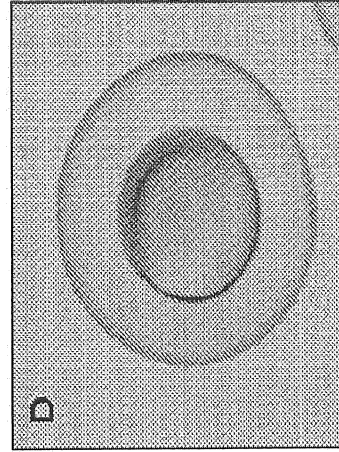


FIG. 3D

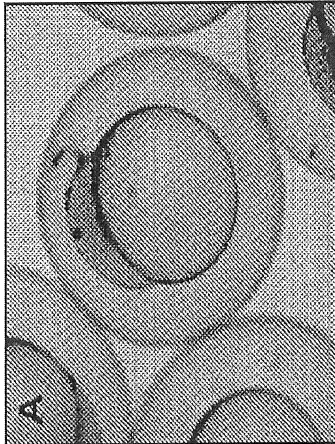


FIG. 3A

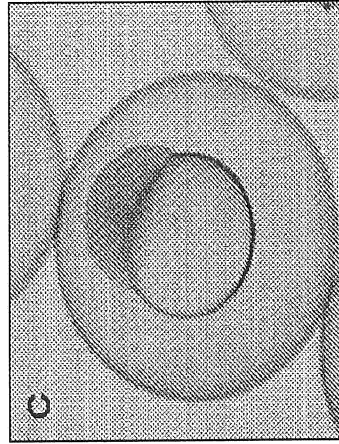


FIG. 3C

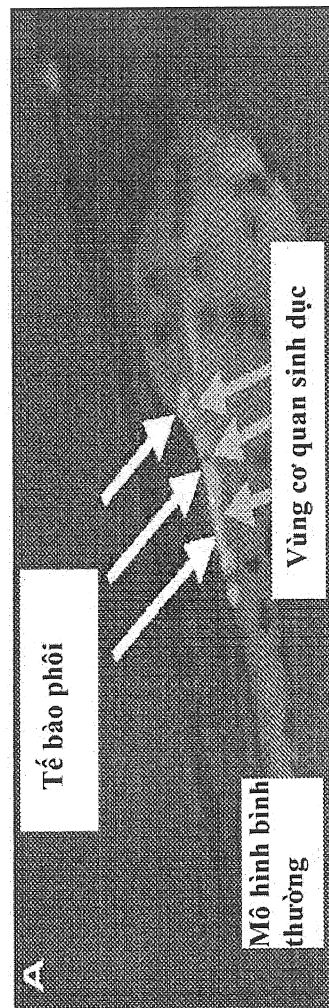


FIG.4A

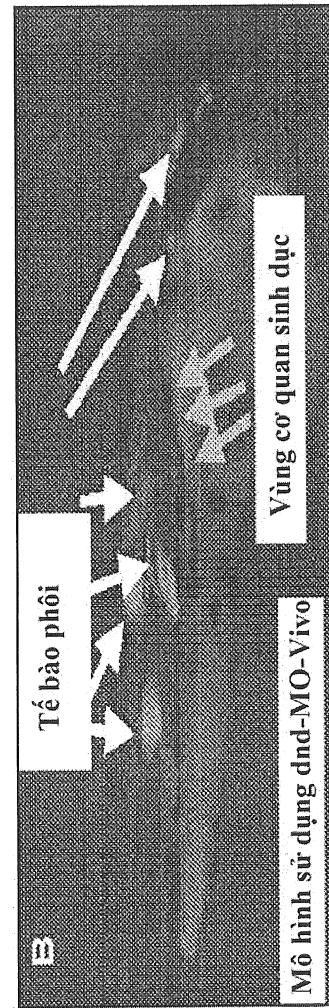


FIG.4B

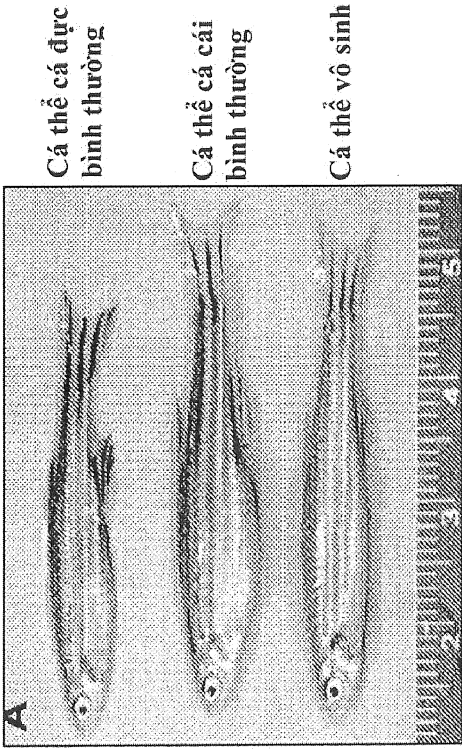


FIG.5A

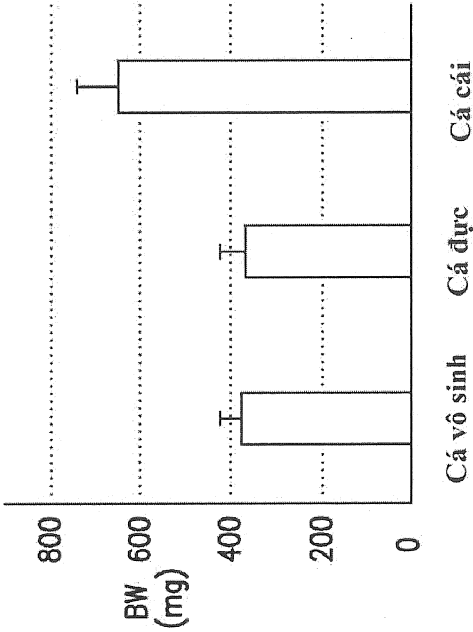


FIG.5B

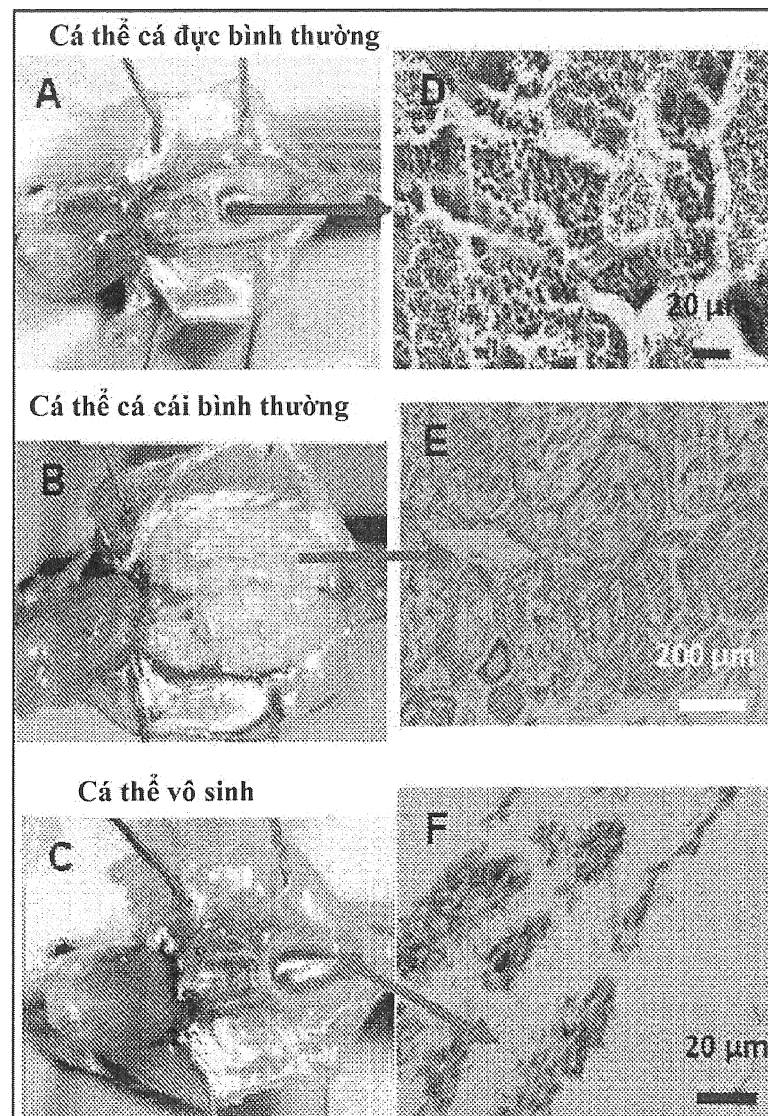


FIG.6

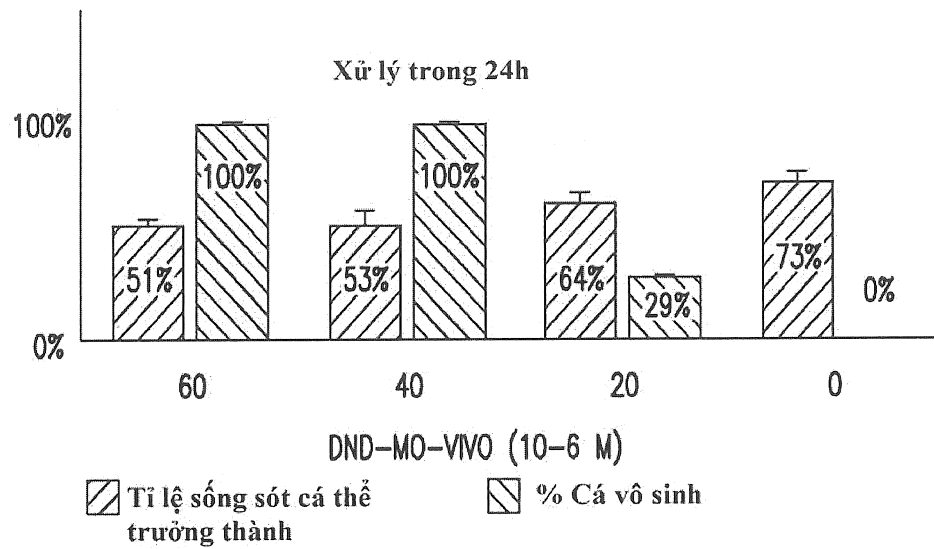


FIG.7A

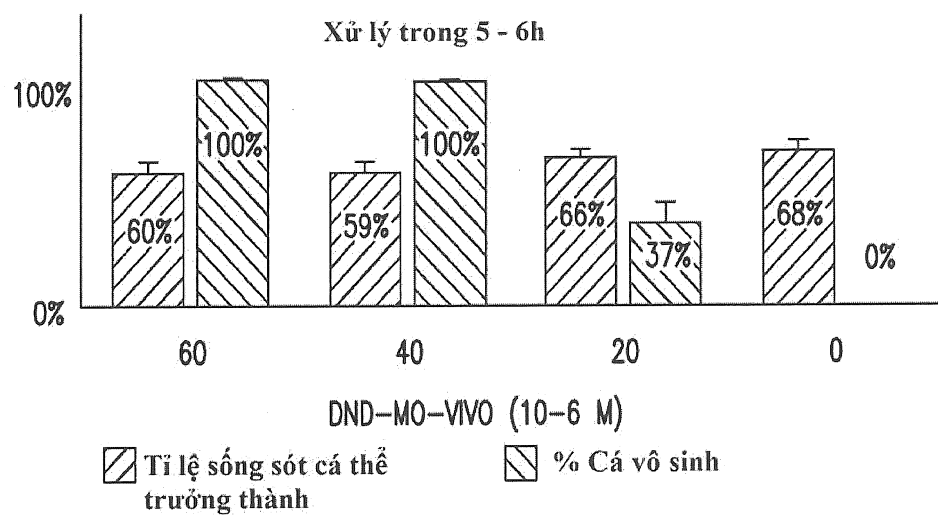


FIG.7B

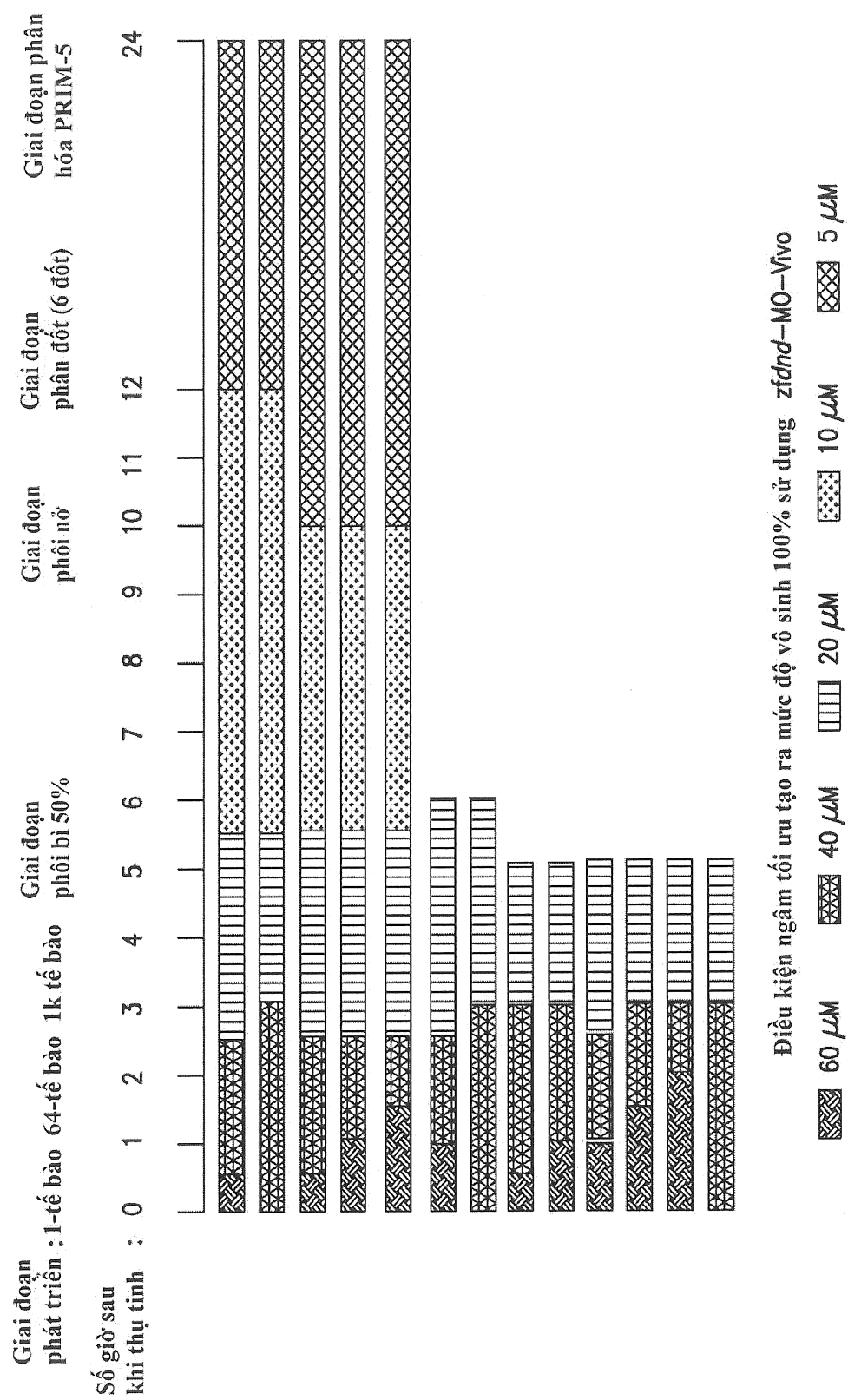


FIG.8

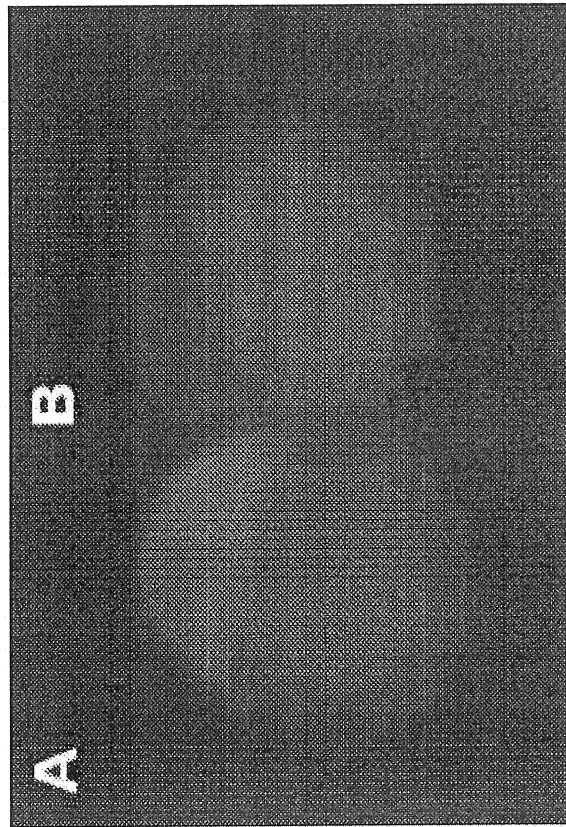


FIG.9

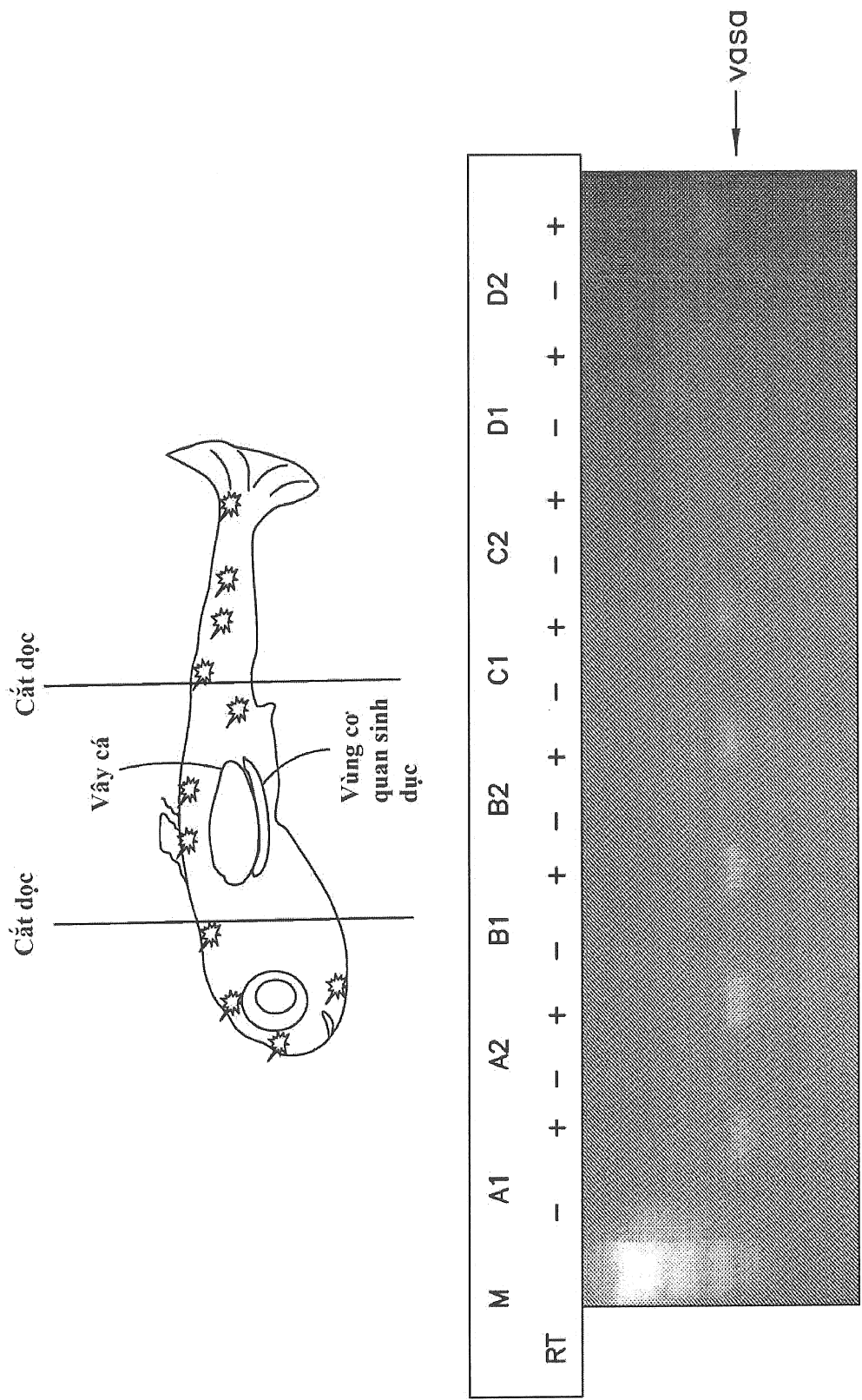


FIG.10