



(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)



1-0034068

(51)^{2020.01} C12N 15/113; A61K 31/713

(13) B

(21) 1-2017-03982

(22) 06/10/2017

(30) 105135598 02/11/2016 TW

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/05/2018 362A

(73) NATIONAL PINGTUNG UNIVERSITY OF SCIENCE & TECHNOLOGY (TW)
No.1, Hseuh Fu Road, Neipu Hsiang, Pingtung County, Taiwan

(72) Wen-Teng Cheng (TW); Chin-Chyuan Chang (TW); Wan-Lin Tsai (TW).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) ARN SỢI KÉP ĐỂ CẢI THIỆN HỆ MIỄN DỊCH Ở TÔM

(57) Sáng chế đề cập đến ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm. ARN sợi kép có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 1 và 2, các SEQ ID NO: 3 và 4, hoặc các SEQ ID NO: 5 và 6.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các ARN sợi kép, và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngày nay, ngành nuôi tôm đang bùng nổ ở Đài Loan. Tôm nuôi không chỉ có thể được sử dụng làm nguồn thực phẩm, mà còn được xuất khẩu ra nước ngoài vì lợi ích kinh tế. Để giảm chi phí, tôm nuôi thường được nuôi với mật độ cao.

Việc nuôi với mật độ cao có thể dẫn đến sự giảm chất lượng của môi trường nuôi, và do đó, tôm nuôi có tỷ lệ chết cao hơn do sự lây nhiễm chéo. Mặc dù việc bổ sung các kháng sinh có thể làm giảm tỷ lệ chết, sự lạm dụng kháng sinh là nguyên nhân gây ra phản ứng dị ứng, cũng như là nguyên nhân gây kháng thuốc.

Cần nhắc đến vấn đề này, cần có các ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất các ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm, là ARN sợi kép đặc hiệu đối với tyrosin hydroxylaza.

Một phương án của sáng chế đề xuất các ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.

Phương án khác của sáng chế đề xuất các ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4.

Phương án khác nữa của sáng chế đề xuất ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn từ phần mô tả chi tiết được đưa ra sau đây và các hình vẽ kèm theo được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và do đó không giới hạn sáng chế, trong đó:

Fig.1a thể hiện hoạt tính tyrosin hydroxylaza của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A1-A4 trong thử nghiệm (A);

Fig.1b thể hiện dopamin trong tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A1-A4 trong thử nghiệm (A);

Fig.1c thể hiện mức norepinephrin của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A1-A4 trong thử nghiệm (A);

Fig.2a thể hiện lượng haemocyt tổng cộng của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm B1-B4 trong thử nghiệm (B);

Fig.2b thể hiện hoạt tính phenoloxidaza của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm B1-B4 trong thử nghiệm (B);

Fig.3a thể hiện hoạt tính thực bào của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm C1-C4 trong thử nghiệm (C);

Fig.3b thể hiện hiệu quả làm sạch của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm C1-C4 trong thử nghiệm (C); và

Fig.4 thể hiện tỷ lệ chết của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm D0-D4 trong thử nghiệm (D).

Trong các hình vẽ khác nhau, các số chỉ dẫn giống nhau được dùng để tham chiếu đến cùng một chi tiết hoặc các chi tiết tương tự nhau. Hơn nữa, khi thuật ngữ “thứ nhất”, “thứ hai”, “thứ ba” và các thuật ngữ tương tự được sử dụng ở đây, cần hiểu rằng các thuật ngữ này chỉ nhằm mục đích minh họa kết cấu được thể hiện trên các hình vẽ vốn sẽ xuất hiện trước mắt người xem, và được sử dụng chỉ để thuận lợi cho việc mô tả sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tôm theo sáng chế là tôm nuôi bao gồm nhưng không giới hạn ở tôm thẻ chân trắng Thái Bình Dương (*Litopenaeus vannamei*), tôm sú (*Penaeus monodon*), tôm he Nhật Bản (*Marsupenaeus japonicus*), tôm thẻ chân trắng Trung Quốc (*Fenneropenaeus schinensis*), tôm he Ấn Độ (*Fenneropenaeus indicus*), tôm rảo (*Metapenaeus ensis barbata*), tôm thẻ đuôi đỏ (*Penaeus penicillatus*) và tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*).

ARN sợi kép đặc hiệu đối với tyrosin hydroxylaza (được viết tắt là TH dsARN), theo sáng chế là ARN sợi kép có các trình tự axit nucleic tương ứng với các trình tự của tyrosin hydroxylaza, sao cho bằng cách đưa TH dsARN vào cơ thể tôm, TH dsARN có

thể phong bế hoạt tính tyrosin hydroxylaza, như được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực. Ví dụ, TH dsARN có thể có nhưng không giới hạn ở các trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, các trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, hoặc các trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6.

TH dsARN có thể được sử dụng để phong bế hoạt tính tyrosin hydroxylaza; và do đó, TH dsARN có thể được đưa vào cơ thể tôm ở liều hiệu quả để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm.

Ví dụ, TH dsARN có thể được đưa vào cơ thể tôm bằng cách tiêm, tốt nhất là bằng cách tiêm vào xoang bụng của phần đầu ngực. Xoang bụng gần tim là lỗ mở huyết dịch ở tôm, sao cho TH dsARN có thể đi vào mô theo huyết dịch. Theo phương án này, tôm có trọng lượng $11,63 \pm 2,1$ gam được sử dụng, và liều lượng hiệu quả là 1-6 $\mu\text{g/g}$, tốt hơn là 5 $\mu\text{g/g}$.

Để đánh giá TH dsARN thể hiện hiệu quả trong cải thiện hệ miễn dịch ở tôm, cũng như làm giảm tỷ lệ chết gây ra bởi sự tấn công của các mầm bệnh, các thử nghiệm sau đây được thực hiện.

Thử nghiệm A

Tôm thẻ chân trắng, *Litopenaeus vannamei*, thu từ nông trại thương mại ở Pingtung, Taiwan. Tôm thẻ chân trắng được làm thích nghi trong môi trường phòng thí nghiệm (nước ngọt; độ mặn 20 phần nghìn (parts per thousand: ppt); nhiệt độ $27 \pm 1^\circ\text{C}$; độ pH 8,2-8,7) trong thời gian 2 tuần trước khi thử nghiệm.

Tham chiếu trong bảng 1, TH dsARN (các mã nhận biết SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2) được đưa vào tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm A2 bằng cách tiêm, và các dsARN đối chứng thử thách không đặc hiệu đối với tyrosin hydroxylaza được đưa vào tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A3 và A4 bằng cách tiêm. Liều của mỗi dsARN là 5 $\mu\text{g/g}$. Tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm A1 không dùng dsARN được sử dụng làm đối chứng. Hoạt tính tyrosin hydroxylaza được đo 3 ngày sau đó.

Bảng 1

Nhóm	ARN sợi kép
A1	DEPC-H ₂ O

A2	dsARN đặc hiệu với tyrosin hydroxylaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2)
A3	dsARN đặc hiệu với glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8)
A4	dsARN đặc hiệu với gen không đặc hiệu ở ký sinh trùng (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10)

Tham chiếu trên Fig.1a, hoạt tính tyrosin hydroxylaza trong tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm A2 thấp hơn đáng kể so với tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A1 và A3-A4.

Hơn nữa, tyrosin hydroxylaza được biết đến là enzym quan trọng để tạo ra dopamin và epinephrin, và sự biểu hiện quá mức của cả hai dopamin và epinephrin có thể làm suy giảm hệ miễn dịch của tôm thẻ chân trắng.

Do đó, để chứng minh TH dsARN có cải thiện hệ miễn dịch bằng cách ức chế cả hai dopamin và epinephrin, mức dopamin và mức epinephrin của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A1-A4 được đo lại. Như được thể hiện trên Fig.1b và Fig.1c, không có sự khác biệt đáng kể trong các mức dopamin và epinephrin quan sát được giữa tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm A1-A4.

Thử nghiệm (B)

dsARN được thể hiện trong bảng 2 được đưa vào tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm B2-B4 (liều lượng: 5 µg/g). Sau 3 ngày, huyết dịch được rút từ xoang bụng của mỗi cá thể tôm. Các thông số miễn dịch, chẳng hạn như tổng số huyết bào (total haemocyte count: THC) và hoạt tính phenoloxidaza (PO) trong các huyết bào của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm B1-B4 được đo lại.

Bảng 2

Nhóm	ARN sợi kép
B1	DEPC-H ₂ O
B2	dsARN đặc hiệu với tyrosin hydroxylaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2)
B3	dsARN đặc hiệu với glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8)
B4	dsARN đặc hiệu với gen không đặc hiệu ở ký sinh trùng (các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10)

Tham chiếu trên Fig.2a và Fig.2b, các thông số miễn dịch của tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm B2 cao hơn so với tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm B1 và B3-B4, cho thấy rằng việc sử dụng TH dsARN làm cải thiện hệ miễn dịch của tôm thẻ chân trắng.

Thử nghiệm (C)

dsRNA được thể hiện trong bảng 3 được dùng cho tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm C2-C4 (liều lượng: 5 µg/g). Sau 3 ngày, huyền phù vi khuẩn *V. alginolyticus* được sử dụng để thử thách tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm C1-C4 (liều lượng: 2×10^5 CFU/cá thể tôm) trong thời gian 1,5 giờ. Huyết dịch được rút từ xoang bụng của mỗi cá thể tôm. Đối với tính miễn cảm của tôm thẻ chân trắng được nhận TH dsARN chống lại sự nhiễm trùng *V. alginolyticus*, hoạt tính thực bào và hiệu quả làm sạch của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm C1-C4 được đo lại.

Bảng 3

Nhóm	ARN sợi kép
C1	DEPC-H ₂ O
C2	dsARN đặc hiệu với tyrosin hydroxylaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2)
C3	dsARN đặc hiệu với glyxeraldehyt 3-phosphat dehydrogenaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8)
C4	dsARN đặc hiệu với gen không đặc hiệu ở ký sinh trùng (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10)

Tham chiếu trên Fig.3a và Fig.3b, hoạt tính thực bào và hiệu quả làm sạch trong tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm C2 cao hơn đáng kể so với tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm C1 và C3-C4, cho thấy việc dùng TH dsARN là hữu ích làm suy yếu *V. alginolyticus* trong huyết dịch.

Thử nghiệm (D) – Thử nghiệm thử thách *V. alginolyticus*

Để xác định độ miễn cảm của tôm thẻ chân trắng nhận TH dsARN chống lại sự nhiễm *V. alhinolyticus*, các dsARN được thể hiện trong bảng 4 được đưa vào cơ thể tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm D2-D4 (liều lượng: 5 µg/g). Sau 3 ngày, huyền phù vi khuẩn *V. alginolyticus* được sử dụng để thử thách tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm D1-D4 (liều lượng: 2×10^5 CFU/cá thể tôm). Tỷ lệ chết được ghi lại ở các thời điểm 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 và 168 giờ.

Bảng 4

Nhóm	<i>V. alginolyticus</i>	ARN sợi kép
D0	-	DEPC-H ₂ O
D1	+	DEPC-H ₂ O
D2	+	dsARN đặc hiệu với tyrosin hydroxylaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2)
D3	+	dsARN đặc hiệu với glyxeraldehyt 3-phosphat đehydrogenaza (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8)
D4	+	dsARN đặc hiệu với gen không đặc hiệu ở ký sinh trùng (trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10)

Tham chiếu trên Fig.4, vào thời điểm 168 giờ sau khi thử thách bằng vi khuẩn, tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm D0 là 0, và tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ chân trắng thuộc các nhóm D1, D3-D4 là khoảng 70-80%. Tuy nhiên, tỷ lệ chết tích lũy của tôm thẻ chân trắng thuộc nhóm D2 giảm xuống (khoảng 50%), cho thấy việc sử dụng TH dsARN làm giảm hiệu quả nguy cơ chết do nhiễm trùng *V. alginolyticus* trong tôm thẻ chân trắng.

Theo đó, bằng cách dùng ARN sợi kép đặc hiệu với tyrosin hydroxylaza (TH dsARN) vào cơ thể tôm, các thông số miễn dịch chẳng hạn như tổng số huyết bào và hoạt tính phenoloxidaza được cải thiện, hoạt tính thực bào và hiệu quả làm sạch được tăng lên và tỷ lệ chết gây ra bởi sự tấn công của mầm bệnh được giảm xuống. Với hiệu quả đó, người nông dân có thể giảm sử dụng thuốc kháng sinh.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết dựa trên các phương án ưu tiên, cần hiểu rằng người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực có thể thực hiện các sửa đổi khác nhau mà không tách rời khỏi nguyên lý và phạm vi của sáng chế như được thiết lập trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Chỉ dẫn tham chiếu:

Đơn sáng chế này hưởng quyền ưu tiên đối với các đơn xin cấp Patent Đài Loan số 105135598, được nộp vào ngày 02 tháng 11 năm 2016, được kết hợp bằng cách tham chiếu toàn bộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm, khác biệt ở chỗ ARN sợi kép là ARN sợi kép đặc hiệu đối với tyrosin hydroxylaza.
2. ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm theo điểm 1, trong đó ARN sợi kép có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.
3. ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm theo điểm 1, trong đó ARN sợi kép có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4.
4. ARN sợi kép để cải thiện hệ miễn dịch ở tôm theo điểm 1, trong đó ARN sợi kép có trình tự ADN được thể hiện như nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6.

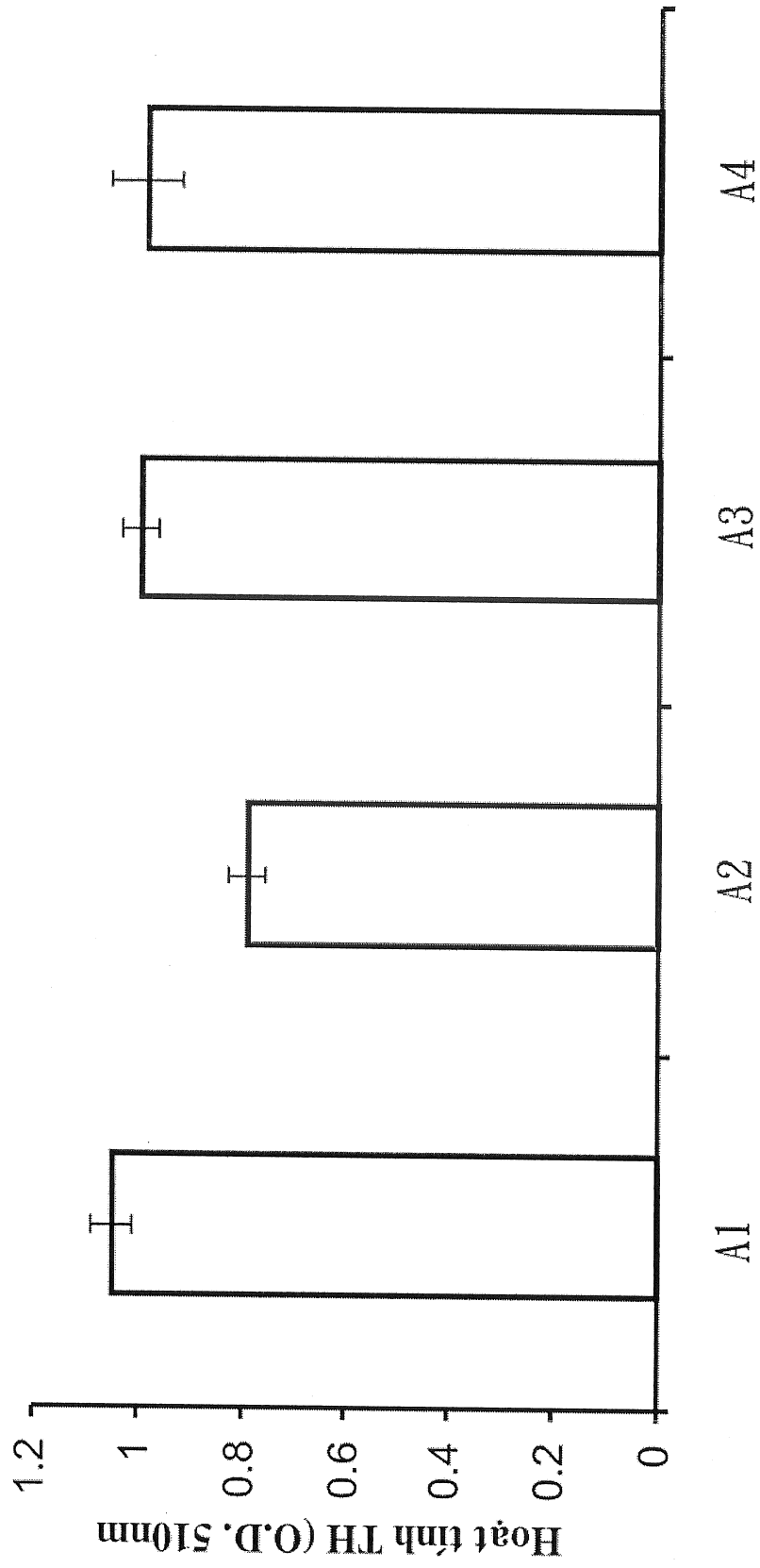


FIG.1a

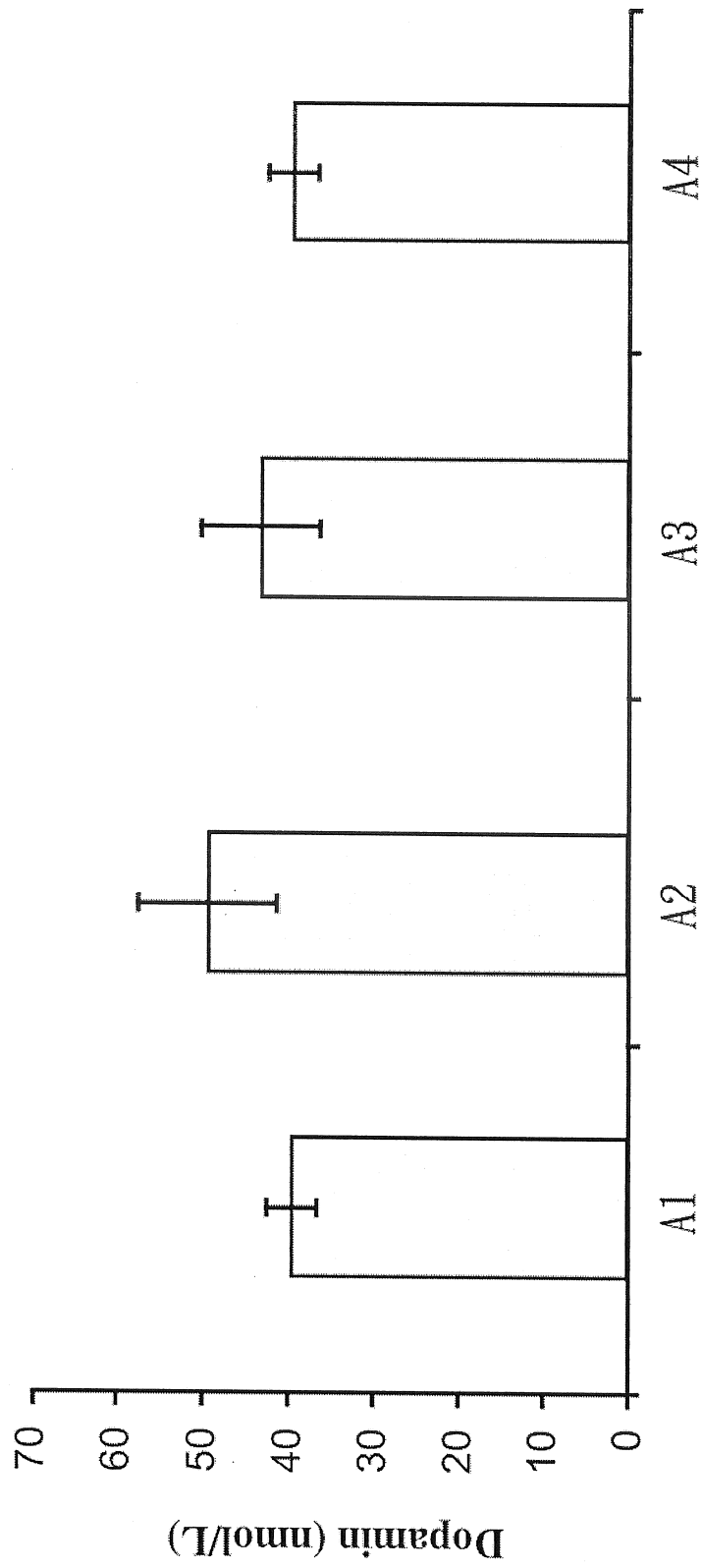


FIG.1b

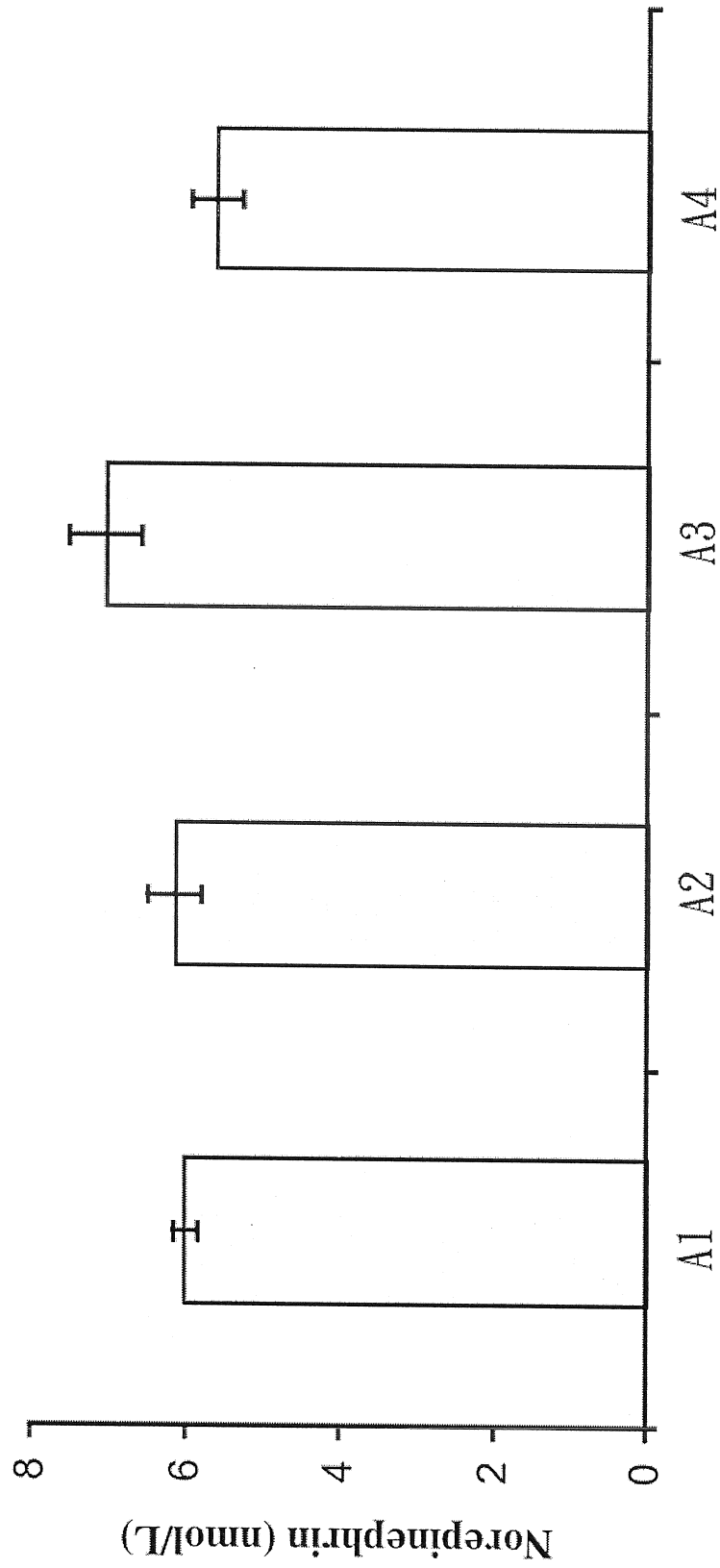


FIG.1c

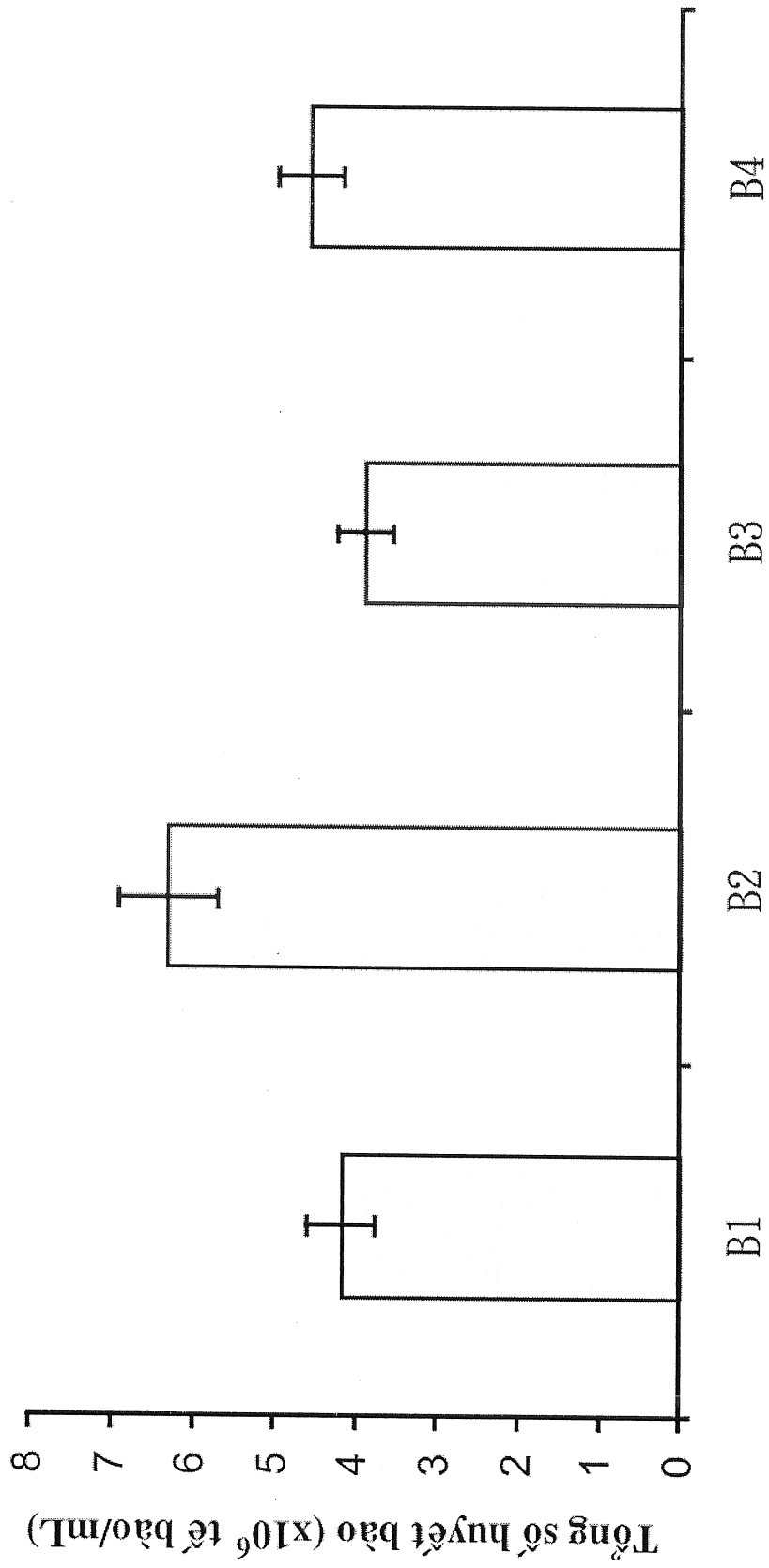


FIG.2a

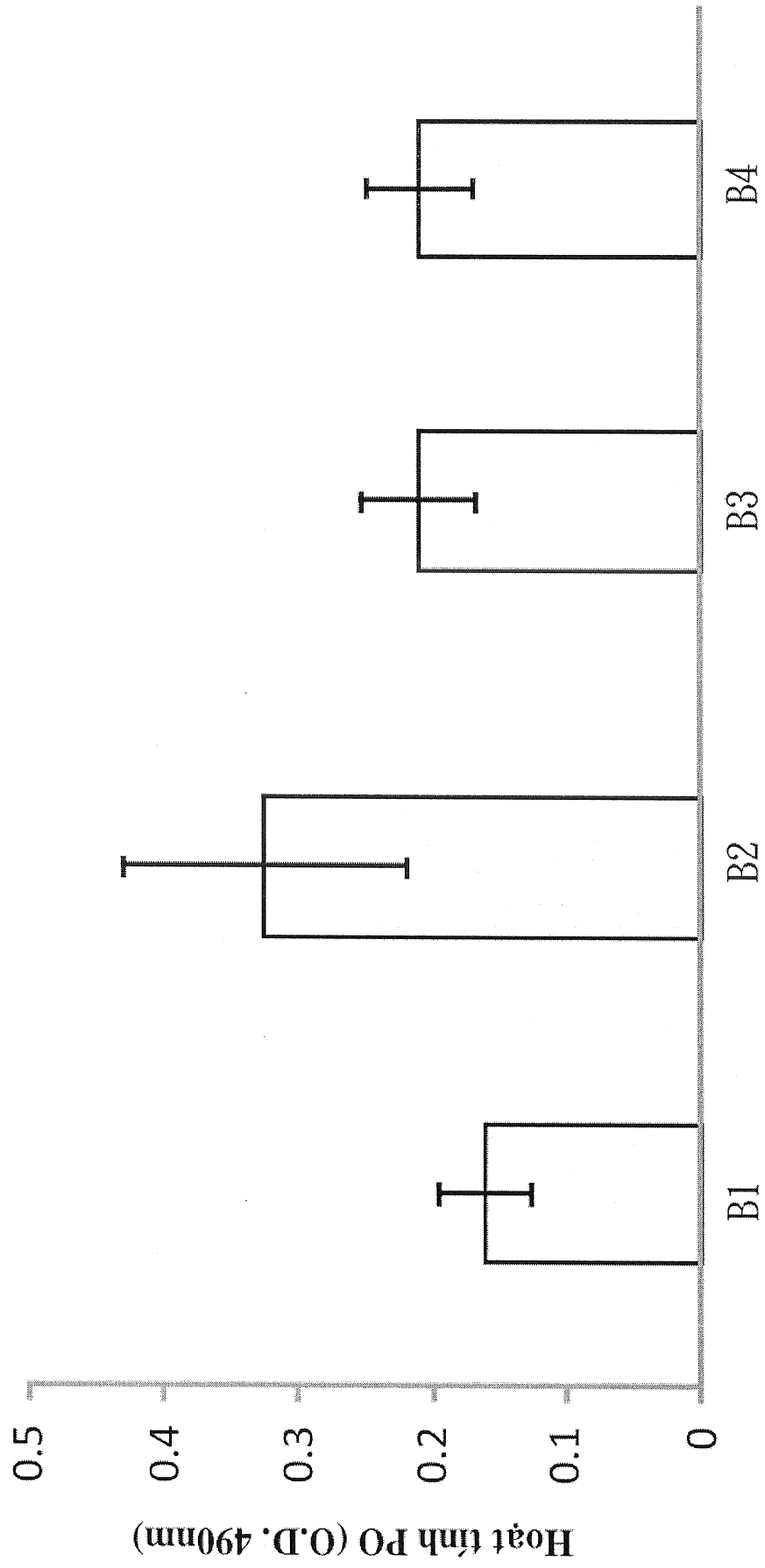


FIG.2b

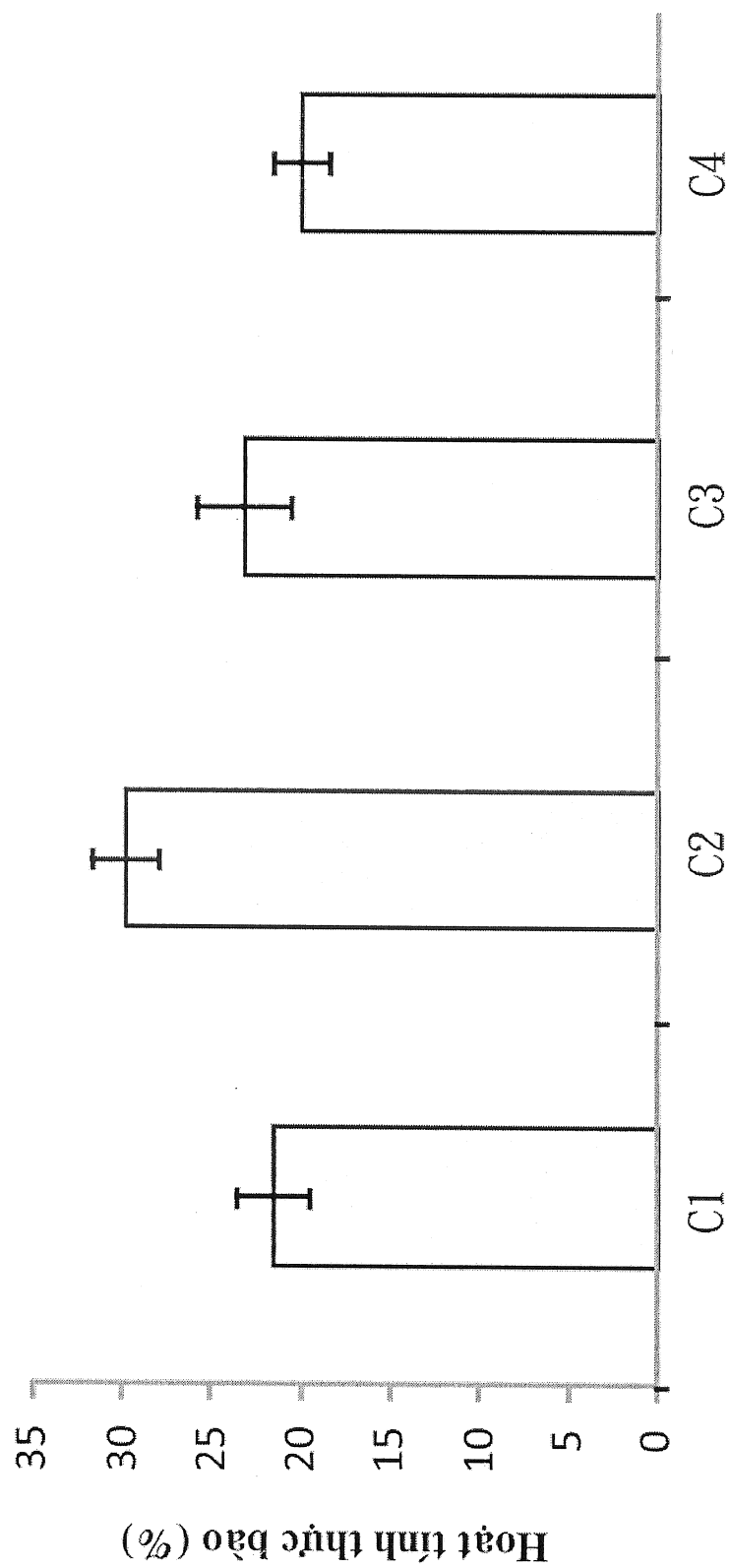


FIG.3a

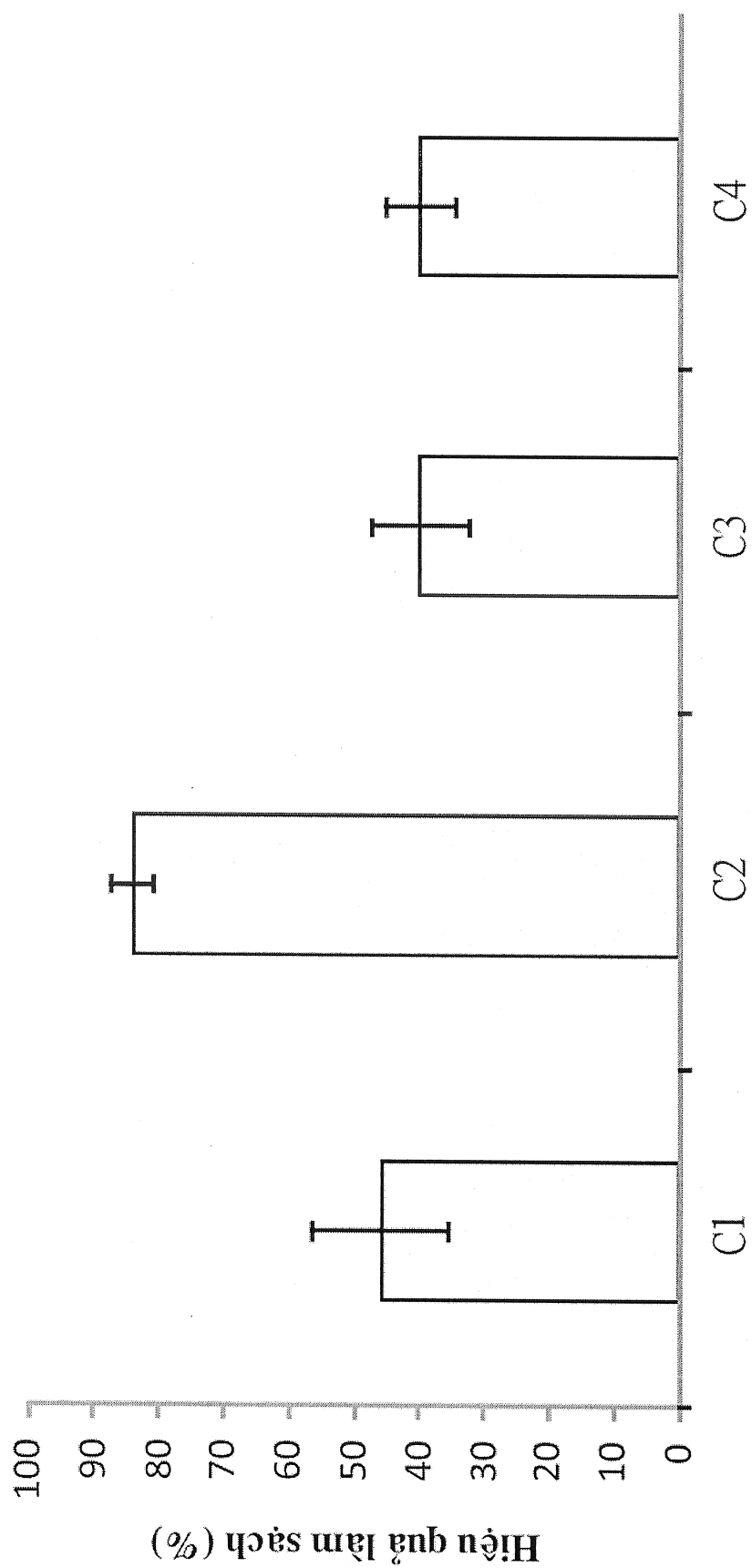
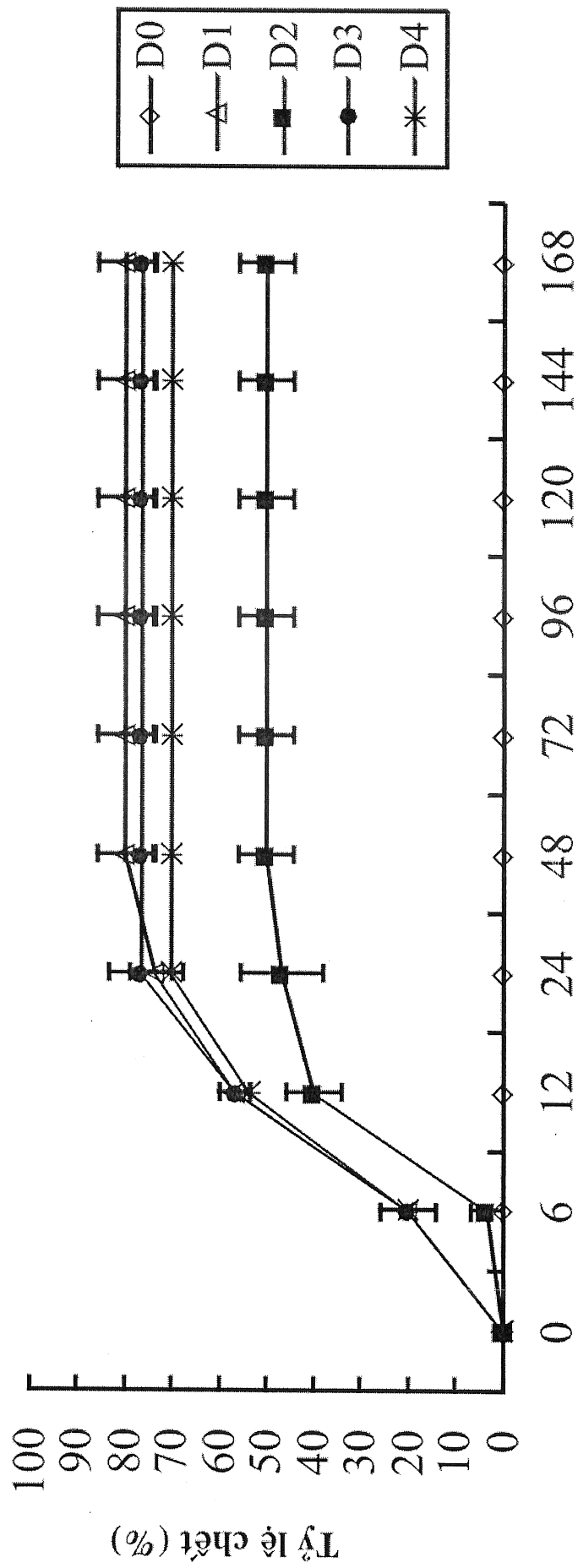


FIG.3b



Giờ sau khi nhiễm trùng

FIG.4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> National Pingtung University of Science and Technology

<120> ARN SỢI KÉP ĐỂ CẢI THIẾN HỆ MIỄN DỊCH Ở TÔM

<130> PK14577US

<150> 105135598

<151> 2016-11-02

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LvTH dsARN

<400> 1

gcaucacucu ucgaucaaat t

21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LvTH dsARN

<400> 2

uuugaucgaa gagugaugct t

21

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LvTH dsARN

<400> 3

ccaaguucga gagcaccat t

21

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> LvTH dsARN

<400> 4		
auggugcucu cgaacuuggt t		21
<210> 5		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> LvTH dsARN		
<400> 5		
ccaggagauc gagaaguuut t		21
<210> 6		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> LvTH dsARN		
<400> 6		
aaacuucucg aucuccuggt t		21
<210> 7		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> GAPDH dsARN		
<400> 7		
ugaccucaac uacaugguut t		21
<210> 8		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> GAPDH dsARN		
<400> 8		
aaccauguag uugaggucat t		21
<210> 9		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		

<220>

<223> dsARN ở ký sinh trùng

<400> 9

uucuccgaac gugucacgut t

21

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> dsARN ở ký sinh trùng

<400> 10

acgugacacg uucggagaat t

21