



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

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

(11)



1-0035624

(51)⁷ A61K 48/00; A01K 67/033; C12N
15/113; C07H 21/04; A01K 61/59;
A61K 31/713

(13) B

(21) 1-2019-01883

(22) 27/10/2017

(86) PCT/JP2017/038853 27/10/2017

(87) WO 2018/084077 11/05/2018

(30) 2016-214411 01/11/2016 JP

(45) 25/05/2023 422

(43) 26/08/2019 377A

(73) JAPAN INTERNATIONAL RESEARCH CENTER FOR AGRICULTURAL
SCIENCES (JP)

1-1, Owashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 3058686, Japan

(72) KANG, Bong Jung (KR); WILDER, Marcy (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP GIẢI PHÓNG SỰ ỨC CHẾ THÀNH THỰC NOÃN BÀO Ở TÔM
NUÔI

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp giải phóng sự điều hòa thành thực noãn bào bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm bằng phương pháp can thiệp ARN. Sáng chế đề xuất phương pháp phong bế sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm nuôi để được sử dụng làm tôm giống (sau đây là “tôm nuôi”), bao gồm bước ức chế sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) ở tôm bằng cách can thiệp ARN sử dụng ARN chuỗi kép (dsARN) gắn đích mRNA của gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng ở tôm nuôi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều hòa chức năng sinh học bẩm sinh *in vivo* ở tôm sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử. Đặc biệt là, sáng chế đề cập đến phương pháp giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện tại, khoảng 200 tỉ con tôm con được sản xuất trên thế giới để hỗ trợ 3,5 triệu tấn tôm chân trắng sản xuất hàng năm (*Litopenaeus vannamei*), và 800.000 con tôm được sản xuất làm tôm bố mẹ và chỉ được xuất khẩu bởi Hawaii ở Mỹ. Rất khó để làm thành thực một cách nhân tạo tôm *Penaeidae* bao gồm tôm chân trắng. Trong hoàn cảnh này, việc cắt cuống mắt được thực hiện để thúc đẩy quá trình thành thực. Tuy nhiên, việc cắt cuống mắt có vấn đề vì tỷ lệ thành công thành thực thấp. Bên cạnh đó, nó cũng đang bị phê phán bởi sự độc ác với động vật vì một trong các cuống mắt bị lấy ra khỏi con tôm bằng cách cắt bỏ. Nhiệm vụ cấp bách là phát triển công nghệ thúc đẩy sự thành thực để thay thế việc cắt cuống mắt và thực hiện kế hoạch và sản xuất hiệu quả tôm con.

Sự can thiệp ARN (iARN) là một hiện tượng trong đó mARN bị phân cắt theo cách đặc hiệu trình tự bằng ARN chuỗi kép (dsARN) sao cho sự biểu hiện gen bị ức chế. Đã được báo cáo rằng iARN là một dạng bảo vệ phổ biến ở các sinh vật ở mức axit nucleic (xem tài liệu phi sáng chế 1). Trong iARN, khi dsARN được xử lý bởi tác động của Dicer, siARN (ARN can thiệp ngắn) được tạo thành, và siARN đóng vai trò là ARN hướng dẫn để nhận ra trình tự đích và phân tách mARN đích, nhờ đó ức chế sự biểu hiện gen.

Hiện tại, để cho phép tôm trưởng thành thành thực và sinh sản một cách nhân tạo trong trại giống hoặc nơi tương tự, không có sự thay thế cho việc cắt

cuồng mắt. Tuy nhiên, một số trường hợp nghiên cứu nhằm ức chế sự biểu hiện hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) ở tôm như *Penaeus monodon* sử dụng phương pháp can thiệp ARN đã được báo cáo gần đây (xem tài liệu phi sáng chế 1, 2, và 3). Ngoài ra, có những đơn patent nói rằng có thể thúc đẩy sự thành thực theo cùng một cách (xem tài liệu patent 1).

Tài liệu tham khảo

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: Công bố đơn patent Mỹ số US2015/0099702

Tài liệu phi sáng chế

Tài liệu phi sáng chế 1: Tiu và Chan, 2007, FEBS Journal, 274: 4385-4395

Tài liệu phi sáng chế 2: Treerattrakool et al., 2008, FEBS Journal, 275: 970-980

Tài liệu phi sáng chế 3: Treerattrakool et al., 2013, Aquaculture, 404-405: 116-121

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào, bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm dựa vào sự can thiệp ARN.

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả đã thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu để đưa đến một phương pháp điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm, bao gồm bước ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm sử dụng dsARN mà liên kết với mRNA của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm dựa trên nguyên tắc can thiệp ARN. Đó là bước đầu tiên để cho phép điều hòa hiệu quả sự thành thực dựa trên nghiên cứu sinh hóa, nhờ đó phong bế

sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự thành thực *in vivo*. Do đó, các tác giả thấy rằng có thể ức chế hiệu quả sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm sử dụng dsARN như được mô tả trên đây, nhờ đó giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào.

Ngoài ra, các tác giả thấy rằng nhiều gen tham gia vào việc ức chế thành thực noãn bào, và sử dụng hỗn hợp của nhiều dsARN mà mỗi dsARN này có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen liên quan giúp ức chế sự biểu hiện của mỗi gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào với hiệu quả được cải thiện. Điều này dẫn đến sự hoàn thành của sáng chế.

Đặc biệt là, sáng chế được mô tả như sau.

[1] Phương pháp giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm nuôi để được sử dụng làm tôm giống (sau đây là “tôm nuôi”), bao gồm bước ức chế sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) ở tôm bằng cách can thiệp ARN sử dụng ARN chuỗi kép (dsARN) gắn đích mRNA của gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng ở tôm nuôi.

[2] Phương pháp theo điểm [1], trong đó tôm nuôi là tôm thuộc họ *Penaeidae*.

[3] Phương pháp theo điểm [2], trong đó tôm nuôi là tôm chân trắng hoặc tôm he Nhật bản trưởng thành hoặc gần trưởng thành.

[4] Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [3], trong đó ARN chuỗi kép (dsARN) gắn đích mRNA của gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng (VIH) có trình tự nucleotit giống với một phần của trình tự nucleotit của gen VIH, và trong đó chuỗi có nghĩa có khả năng lai với gen này và chuỗi đối nghĩa có trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit của chuỗi có nghĩa được liên kết với nhau trong dsARN.

[5] Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [4], trong đó gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng là một hoặc nhiều loại gen được chọn

từ nhóm bao gồm peptit tuyến nút tôm chân trắng SGP-A, SGP-B, SGP-C, SGP-F, và SGP-G.

[6] Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [1] đến [5], chứa sử dụng một hoặc nhiều loại ARN chuỗi kép (dsARN) được chọn từ nhóm bao gồm: ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28 để gắn đích gen SGP-A; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30 để gắn đích gen SGP-B; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33 để gắn đích gen SGP-C; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36 để gắn đích gen SGP-F; và ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 để gắn đích gen SGP-G.

[7] Chế phẩm giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm nuôi bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) ở tôm, chứa ARN chuỗi kép (dsARN) gắn đích mRNA của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH), trong đó dsARN có trình tự nucleotit giống với một phần của trình tự nucleotit của gen VIH, và trong đó chuỗi có nghĩa có khả năng lai với gen này và chuỗi đối nghĩa có trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit của chuỗi có nghĩa được liên kết với nhau trong dsARN.

[8] Chế phẩm theo điểm [7], trong đó tôm nuôi là tôm thuộc họ *Penaeidae*.

[9] Chế phẩm theo điểm [8], trong đó tôm nuôi là tôm chân trắng hoặc tôm he Nhật bản trưởng thành hoặc gần trưởng thành.

[10] Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [7] đến [9], trong đó gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng là một hoặc nhiều loại gen được chọn từ nhóm bao gồm peptit tuyến nút tôm chân trắng SGP-A, SGP-B, SGP-C, SGP-F, và SGP-G.

[11] Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ [7] đến [10], chứa một hoặc nhiều loại ARN chuỗi kép (dsARN) được chọn từ nhóm bao gồm: ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28 để gắn đích gen SGP-A; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30 để gắn đích gen SGP-B; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33 để gắn đích gen SGP-C; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36 để gắn đích gen SGP-F; và ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 để gắn đích gen SGP-G.

Phần mô tả bao gồm một phần hoặc toàn bộ nội dung như được bộc lộ trong phần mô tả và/hoặc hình vẽ của đơn patent Nhật số 2016-214411, đây là tài liệu ưu tiên của đơn này.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Việc sử dụng ARN chuỗi kép (dsARN) theo sáng chế làm cho có thể ức chế sự biểu hiện của gen chịu trách nhiệm ức chế sự thành thực noãn bào ở tôm dựa trên nguyên tắc can thiệp ARN, nhờ đó giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào. Như được mô tả trên đây, bằng cách thúc đẩy sự thành thực noãn bào ở tôm trong đó sự thành thực noãn bào được ức chế thành công, có thể sản xuất tôm con một cách có kế hoạch và hiệu quả.

Việc sử dụng ARN chuỗi kép (dsARN) theo sáng chế có thể làm giảm sự biểu hiện gen trong toàn bộ các cá thể trong 10 ngày. Tình trạng này có thể được duy trì trong ít nhất 30 ngày. Ngoài ra, trong trường hợp sử dụng dsARN theo sáng chế, tỷ lệ giảm sự biểu hiện gen nằm trong khoảng từ 76,9% đến 99,9%. Trong khi đó, theo các kết quả thu được từ các nhóm khác dựa vào sự can thiệp ARN bộc lộ trong, ví dụ, Feijo et al. (2016), Mar Biotechnol. 18:117-123, tỷ lệ giảm sự biểu hiện gen chỉ là nằm trong khoảng từ 64% đến 73% sau khi sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 mô tả khái niệm về phương pháp theo sáng chế.

Fig. 2 mô tả trình tự nucleotit và trình tự axit amin được suy ra của VIH (SGP-G) cADN ở tôm chân trắng. Mỗi mũi tên (∇) đại diện cho một vị trí phân cắt giả định, và mỗi vị trí đoạn mỗi dsARN được gạch chân kép. Số lượng của các nucleotit được chỉ định bên phải.

Fig. 3 mô tả kết quả đo của sự biểu hiện gen VIH trong cuống mắt bằng PCR bán định lượng. “Ban đầu” thể hiện biểu đồ không tiêm, “TE” thể hiện biểu đồ tiêm đệm TE (Tris-EDTA), “GFP” thể hiện biểu đồ mà tiêm GFP-dsARN, và “VIH” thể hiện biểu đồ mà tiêm VIH-dsARN.

Fig. 4 mô tả kết quả đo của sự biểu hiện gen VIH ở cuống mắt của tôm trưởng thành bằng PCR định lượng. (N) đại diện cho số lượng cá thể được phân tích, và “*” cho thấy sự khác biệt đáng kể liên quan đến “Ban đầu” ($P < 0,05$).

Fig. 5 mô tả trình tự nucleotit và trình tự axit amin được suy ra của SGP-C cADN ở tôm chân trắng. Mỗi mũi tên ($\downarrow$) đại diện cho vị trí phân cắt giả định, và mỗi vị trí đoạn mỗi dsARN được gạch chân kép. Số lượng các nucleotit được chỉ định bên phải, số lượng các axit amin được chỉ định bên trái.

Fig. 6 mô tả trình tự nucleotit và trình tự axit amin được suy ra của SGP-A cADN trong tôm chân trắng. Mỗi mũi tên ($\downarrow$) đại diện cho vị trí phân cắt giả định, mỗi vị trí đoạn mỗi dsARN được gạch chân kép, và mỗi vị trí dsARN được tổng hợp được viết đậm. Số lượng các nucleotit được chỉ định bên phải.

Fig. 7 mô tả trình tự nucleotit và trình tự axit amin được suy ra của SGP-B cADN trong tôm chân trắng. Mỗi mũi tên ($\downarrow$) đại diện cho vị trí phân cắt giả định, mỗi vị trí đoạn mỗi dsARN được gạch chân kép, và mỗi vị trí dsARN được tổng hợp được viết đậm. Số lượng trình tự nucleotit được thể hiện ở phía bên phải. Phần gạch chân chỉ ra rằng trình tự axit amin được suy ra từ cADN khác với trình tự peptit được báo cáo.

Fig. 8 mô tả trình tự nucleotit và trình tự axit amin được suy ra của SGP-F cADN trong tôm chân trắng. Mỗi mũi tên ($\downarrow$) đại diện cho vị trí phân cắt giả định, mỗi vị trí đoạn mồi dsARN được gạch chân kép, và mỗi vị trí dsARN được tổng hợp được viết đậm. Số lượng các nucleotit được chỉ định bên phải. Phần gạch chân chỉ ra rằng trình tự axit amin được suy ra từ cADN khác với trình tự peptit được báo cáo.

Fig. 9 mô tả kết quả đo của sự biểu hiện gen VIH trong cuống mắt tôm gần trưởng thành bằng PCR định lượng. (N) đại diện số lượng các cá thể được phân tích, và “*” cho thấy sự khác biệt đáng kể liên quan đến “Ban đầu” ($P < 0,05$).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bên dưới.

Sáng chế đề cập đến phương pháp giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào, bao gồm việc ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm dựa vào sự can thiệp ARN.

Sự ức chế thành thực noãn bào xảy ra ở tôm nuôi. Thông thường, việc cắt cuống mắt được tiến hành để thúc đẩy sự thành thực noãn bào. Theo sáng chế, sự ức chế thành thực noãn bào được giải phóng bởi ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm nuôi.

Tôm mà trong đó sự ức chế thành thực noãn bào được giải phóng bởi phương pháp theo sáng chế là tôm thuộc họ *Penaeidae*, bao gồm tôm he Nhật Bản (*Penaeus japonicus*), tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*), tôm trắng Trung Quốc (*Penaeus chinensis*), tôm sú vằn (*Penaeus semisulcatus*), tôm sú đen (*Penaeus monodon*), và tôm gân (*Melicertus latisulcatus*). Trong số này, tôm chân trắng hoặc tôm he Nhật Bản, được sản xuất hàng loạt làm tôm có thể ăn được, được ưu tiên. Ngoài ra, tôm trưởng thành hoặc tôm gần trưởng thành có thể được sử dụng. Ở đây, tôm gần trưởng thành được định nghĩa là có khối

lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 10 g đến nhỏ hơn 25 g, và tôm trưởng thành được định nghĩa là có khối lượng cơ thể là 35 g hoặc lớn hơn.

Gen ức chế sự thành thực noãn bào ở tôm, được xử lý bằng phương pháp theo sáng chế để ức chế sự biểu hiện của gen, là các gen thuộc họ hormon tăng đường huyết của loài giáp xác (CHH). Các ví dụ về gen thuộc họ CHH bao gồm gen hormon tăng đường huyết của loài giáp xác (CHH), gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng (VIH), và gen hormon ức chế sự lột xác (MIH). Thuật ngữ “hormon ức chế sự sinh noãn hoàng” (VIH) còn được gọi là “hormon ức chế tuyến sinh dục”.

Theo sáng chế, sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng (VIH) thuộc họ hormon tăng đường huyết của loài giáp xác (CHH) bị ức chế. Các ví dụ về gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng (VIH) bao gồm gen peptit tuyến nút (SGP). Có bảy peptit tuyến nút là SGP-A đến SGP-G. Trong sáng chế, bằng cách ức chế sự biểu hiện của một hoặc nhiều loại gen của năm peptit tuyến nút được gọi là SGP-A, AGP-B, SGP-C, SGP-F, và SGP-G, có thể ức chế sự biểu hiện của hormon ức chế sự sinh noãn hoàng để tạo điều kiện cho sự sản xuất protein noãn hoàng đối với sự thành thực noãn bào, nhờ đó điều hòa sự thành thực noãn bào.

Như được mô tả bên dưới, trình tự nucleotit của gen và trình tự axit amin của peptit được mã hóa bởi các gen này được chỉ ra trong SEQ ID NO: 1 đến 10.

SEQ ID NO: 1 trình tự nucleotit SGP-A

SEQ ID NO: 2 trình tự axit amin SGP-A

SEQ ID NO: 3 Trình tự nucleotit SGP-B

SEQ ID NO: 4 Trình tự axit amin SGP-B

SEQ ID NO: 5 Trình tự nucleotit SGP-C

SEQ ID NO: 6 Trình tự axit amin SGP-C

SEQ ID NO: 7 Trình tự nucleotit SGP-F

SEQ ID NO: 8 Trình tự axit amin SGP-F

SEQ ID NO: 9 Trình tự nucleotit SGP-G

SEQ ID NO: 10 Trình tự axit amin SGP-G

Ngoài ra, trình tự nucleotit và trình tự axit amin của SGP-A được mô tả trong Fig. 6, trình tự nucleotit và trình tự axit amin của SGP-B được mô tả trong Fig. 7, trình tự nucleotit và trình tự axit amin của SGP-C được mô tả trong Fig. 5, trình tự nucleotit và trình tự axit amin của SGP-F được mô tả trong Fig. 8, và trình tự nucleotit và trình tự axit amin của SGP-G được mô tả trong Fig. 2.

Để ức chế sự biểu hiện của gen bất kỳ trong số các gen nêu trên, ARN chuỗi kép (dsARN) bao gồm các chuỗi kép gắn đích mRNA đối với gen có thể được sử dụng. dsARN gây ra sự ức chế (sự làm bất hoạt) biểu hiện của gen đích bằng cách can thiệp ARN. Một chuỗi trong các chuỗi của dsARN này có trình tự nucleotit giống với một phần của trình tự nucleotit của gen liên quan, là chuỗi có nghĩa có thể lai với gen. Chuỗi khác là chuỗi đối nghĩa có trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit của chuỗi có nghĩa. Chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa liên kết bổ sung với nhau, nhờ đó tạo thành dsARN. Lưu ý rằng chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa không nhất thiết phải bổ sung sung cho nhau. Miễn là chúng liên kết bổ sung cho nhau, có thể có một hoặc nhiều bất cặp nhầm, ví dụ, 1 đến 10 bất cặp nhầm, tốt hơn là 1 đến 5 bất cặp nhầm, tốt hơn nữa là 1 đến 3 bất cặp nhầm, và đặc biệt tốt hơn là 2 hoặc 1 bất cặp nhầm. Các trình tự đích trong gen peptit tuyến nút nêu trên có thể là vùng mã hóa hoặc vùng không mã hóa. Mỗi trình tự đích có thể bao gồm cả vùng mã hóa và vùng không mã hóa.

Theo sáng chế, dsARN bao gồm ARN kẹp tóc nhỏ (shARN) và ARN can thiệp nhỏ (siARN). shARN có cấu trúc vòng thân bao gồm phần chuỗi kép trong đó chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa được liên kết với nhau thông qua trình tự

vòng. Trong shARN, đầu 3' của chuỗi có nghĩa và đầu 5' của chuỗi đối nghĩa được liên kết với nhau thông qua vòng (trình tự vòng kẹp tóc). Các ví dụ về trình tự vòng kẹp tóc này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự chứa 5 đến 12 nucleotit bắt đầu bằng UU, ví dụ, UUCAAGAGA. dsARN và shARN được xử lý bằng quy trình *in vivo* thực hiện bằng Dicer, nhờ đó tạo thành siARN. Ngoài ra, dsARN có thể tạo thành miARN. Theo sáng chế, trong trường hợp mà trong đó dsARN có độ dài 30 nucleotit hoặc dài hơn được cung cấp, dsARN được xử lý bằng quy trình do tác động của enzym giống RNaseIII được gọi là “Dicer” sao cho phân tử siARN chứa 21 đến 27 nucleotit và có phần nhô ra chứa hai nucleotit ở đầu 3' có thể được tạo thành.

Số lượng các nucleotit của dsARN là, nhưng không giới hạn ở, 50 đến 800 nucleotit, tốt hơn là 100 đến 500 nucleotit, và tốt hơn nữa là 100 đến 300 nucleotit.

Các ví dụ về chuỗi có nghĩa có khả năng lai với trình tự đích của gen peptit tuyến nút của dsARN để ức chế sự biểu hiện của gen peptit tuyến nút bao gồm chuỗi có nghĩa có trình tự ARN chứa trình tự nucleotit là trình tự một phần của bất kỳ trình tự nào trong số trình tự nucleotit của gen SGP-A được chỉ ra trong SEQ ID NO: 1, trình tự nucleotit của gen SGP-B được chỉ ra trong SEQ ID NO: 3, trình tự nucleotit của gen SGP-C được chỉ ra trong SEQ ID NO: 5, trình tự nucleotit của gen SGP-F được chỉ ra trong SEQ ID NO: 7, và trình tự nucleotit của gen SGP-G được chỉ ra trong SEQ ID NO: 9, trong đó thymin được thay thế bằng uraxil trong trình tự gen.

Đặc biệt là, ví dụ, có thể sử dụng một hoặc nhiều loại ARN chuỗi kép (dsARN) được chọn từ nhóm bao gồm: ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28 để gắn đích gen SGP-A; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30 để gắn đích gen SGP-B; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33 để gắn đích gen SGP-C; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa

chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36 để gắn đích gen SGP-F; và ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 để gắn đích gen SGP-G. Chuỗi đối nghĩa bao gồm trình tự bổ sung cho các chuỗi có nghĩa này lai với chuỗi có nghĩa, nhờ đó tạo thành dsARN. Chuỗi có nghĩa nêu trên có thể được sản xuất bằng cách sử dụng đoạn môi dsARN. Đoạn môi cho ARN chuỗi kép (dsARN) chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28 để gắn đích gen SGP-A có thể là đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 27. Đoạn môi cho ARN chuỗi kép (dsARN) chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30 để gắn đích gen SGP-B có thể là đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 29. Đoạn môi cho ARN chuỗi kép (dsARN) chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33 để gắn đích gen SGP-C có thể là đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 31 và đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 32. Đoạn môi cho ARN chuỗi kép (dsARN) chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36 để gắn đích gen SGP-F có thể là đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 34 và đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 35. Đoạn môi cho ARN chuỗi kép (dsARN) chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 để gắn đích gen SGP-G có thể là đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 37 và đoạn môi chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 38.

Chuỗi có nghĩa cấu thành dsARN theo sáng chế là giống như mong muốn với trình tự nucleotit của gen peptit tuyến nút, tuy nhiên, có thể là trình tự giống nhau về cơ bản. Nói cách khác, miễn là chuỗi có nghĩa của dsARN lai với trình tự mARN của peptit tuyến nút làm đích thực tế, có thể là bất cặp nhằm do đột biến mất đoạn, đột biến thay thế, hoặc đột biến thêm đoạn của một hoặc nhiều nucleotit, ví dụ, 1 đến 10 nucleotit, tốt hơn là 1 đến 5 nucleotit, và tốt hơn nữa là 1 đến 3 nucleotit hoặc 2 hoặc 1 nucleotit.

Để giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm, sự biểu hiện của ít nhất một loại của gen peptit tuyến nút được mô tả nêu trên, tốt hơn là số lượng lớn các gen, ví dụ, hai, ba, bốn, hoặc năm loại gen, bị ức chế. trong trường hợp mà trong đó sự biểu hiện của hai hoặc nhiều loại gen bị ức chế, có thể giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào với hiệu quả được cải thiện. Để ức chế sự biểu hiện của hai hoặc nhiều loại gen, nhiều dsARN, mỗi dsARN có khả năng ức chế sự biểu hiện của gen liên quan có thể được sử dụng.

Chuỗi có nghĩa hoặc chuỗi đối nghĩa cấu thành phân tử dsARN có phần nhô ra ở đầu 3' của nó. Loại và lượng nucleotit của phần nhô này không bị giới hạn. Ví dụ, trình tự chứa 1 đến 5 nucleotit, tốt hơn là 1 đến 3 nucleotit, và tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 nucleotit có thể được sử dụng. Các ví dụ cụ thể bao gồm TTT, UU, và TT. Thuật ngữ “phần nhô ra” được sử dụng ở đây dùng để chỉ nucleotit được bổ sung vào đầu của một phân tử dsARN và không bao gồm nucleotit có thể liên kết bổ sung nucleotit tại các vị trí tương ứng của chuỗi khác.

Theo sáng chế, dsARN có thể được tổng hợp thông qua tổng hợp hóa học hoặc tổng hợp *in vitro* trong hệ thống phiên mã sử dụng trình tự khởi động và ARN polymeraza. Ví dụ, trong trường hợp tổng hợp hóa học, ARN chuỗi đơn tự bổ sung có trình tự và trình tự khác mà là bổ sung trình tự đảo được tổng hợp, nhờ đó cho phép trình tự liên kết với nhau để tạo thành phân tử bổ sung. Quá trình xử lý nhiệt của chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa của dsARN được tổng hợp có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ngoài ra, trong trường hợp mà trong đó dsARN được tổng hợp bằng cách sử dụng trình tự khởi động và ARN polymeraza, ADN khung có cấu trúc, trong đó chuỗi có nghĩa và chuỗi đối nghĩa được liên kết với nhau thông qua xuôi dòng vòng của trình tự khởi động, được tổng hợp để phiên mã ARN sử dụng ARN polymeraza. Trong trường hợp sản xuất *in vitro*, trình tự khởi động T7, trình tự khởi động T3, hoặc trình tự tương tự có thể được sử dụng. Ngoài ra,

trong trường hợp mà trong đó ADN khung của dsARN được đưa vào vectơ và vectơ được sử dụng *in vivo* cho tôm để tổng hợp dsARN *in vivo* theo sáng chế, trình tự khởi động PolIII như trình tự khởi động H1 hoặc trình tự khởi động U6 có thể được sử dụng. Trong trường hợp trong đó vectơ được sử dụng, vectơ plasmit, vectơ virus, hoặc tương tự có thể được sử dụng. Các ví dụ về vectơ plasmit có thể được sử dụng bao gồm vectơ pSUPER và vectơ pBasi. Các ví dụ về vectơ virus có thể được sử dụng bao gồm vectơ adenovirus, vectơ lentivirus, và vectơ retrovirus.

Sáng chế còn bao gồm vectơ có khả năng biểu hiện phân tử dsARN được mô tả trên đây.

Theo sáng chế, dsARN có thể phân cắt mRNA của gen peptit tuyến nút theo cách đặc hiệu trình tự, nhờ đó gây ra sự can thiệp ARN (iARN) để ức chế sự biểu hiện của gen peptit tuyến nút để ức chế sự biểu hiện của gen peptit tuyến nút.

Để ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm sử dụng dsARN theo sáng chế để giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào, dsARN theo sáng chế có thể được sử dụng *in vivo* cho tôm. Việc sử dụng có thể được thực hiện bằng đường miệng cũng như đường tiêm hoặc ngoài đường tiêu hóa như đường trong tĩnh mạch, trong cơ, dưới da và trong màng bụng. Ví dụ, dsARN có thể được tiêm trong màng bụng. Trong trường hợp này, ưu tiên sử dụng kim insulin mảnh khoảng 30G đến 33G. Cũng có thể sử dụng dsARN bằng cách trộn dsARN với thức ăn và cho phép tôm tiêu hóa thức ăn theo sáng chế.

Theo sáng chế, dsARN có thể được bào chế bằng chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược được chấp nhận về mặt dược lý để sử dụng. Các ví dụ về chất mang này bao gồm nước muối sinh lý, nước muối đệm phosphate, dung dịch glucoza nước muối đệm phosphate, và nước muối đệm. Trong trường hợp trong đó dsARN được bào chế bằng chất mang, hàm lượng của dsARN theo sáng chế có thể được xác định một cách thích hợp phụ thuộc vào dạng bào chế, và tốt

hơn nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1% khối lượng, có thể khác nhau tùy thuộc vào dạng bào chế. Theo sáng chế, 0,0001 đến 1 mg dsARN có thể được sử dụng cho tôm một lần hoặc chia thành nhiều lần trong ngày. Ngoài ra, khối lượng phân tử dsARN trên mỗi đơn vị sử dụng nằm trong khoảng từ 1nM đến 100 μ M, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 10nM đến 50 μ M, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 nM đến 20 μ M.

Theo sáng chế, sự ức chế (sự làm bất hoạt) biểu hiện của gen đích bằng cách can thiệp ARN cũng bao gồm trường hợp trong đó khi sự biểu hiện của gen được xác định dựa trên mức độ biểu hiện của mRNA hoặc protein của gen, sự biểu hiện bị ức chế không chỉ ở tỷ lệ 100% mà còn ở tỷ lệ 75% hoặc nhiều hơn, 50% hoặc nhiều hơn, hoặc 20% hoặc nhiều hơn so với trường hợp trong đó siARN theo sáng chế không được đưa vào. Mức độ ức chế của sự biểu hiện gen có thể được xác định bằng cách so sánh việc sản xuất mRNA hoặc protein của gen trước và sau khi đưa vào siARN. Trong trường hợp mRNA, phép đo có thể được thực hiện bằng phương pháp lai bắc, RT-PCR, phương pháp lai tại chỗ, hoặc tương tự. Trong trường hợp protein, phép đo có thể được thực hiện bằng phương pháp thông thường như thẩm tách tây hoặc ELISA.

Sự ức chế thành thực noãn bào có thể được giải phóng bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm sử dụng dsARN theo sáng chế. Theo cách khác, sáng chế bao gồm phương pháp giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm bằng cách sử dụng dsARN theo sáng chế vào tôm, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm. Phương pháp còn được gọi là phương pháp sản xuất tôm trong đó sự ức chế thành thực noãn bào được giải phóng bằng cách sử dụng dsARN theo sáng chế vào tôm, nhờ đó ức chế sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào ở tôm.

Trong trường hợp trong đó dsARN theo sáng chế được sử dụng cho tôm, có thể ức chế hoàn toàn sự biểu hiện của gen có khả năng điều hòa sự thành thực noãn bào trong vòng vài ngày đến hơn mười ngày. Trạng thái ức chế sự

biểu hiện gen có thể được duy trì trong khoảng thời gian từ 10 đến 50 ngày và tốt hơn là 30 ngày. Tỷ lệ ức chế sự biểu hiện gen trong trường hợp sử dụng dsARN theo sáng chế nằm trong khoảng từ 76,6% đến 99,9%.

Như được mô tả trên đây, có thể sản xuất tôm thành thực một cách nhân tạo bằng cách thúc đẩy sự thành thực noãn bào ở tôm tự do từ sự ức chế thành thực noãn bào. Tôm con có thể được sản xuất một cách có kế hoạch và hiệu quả từ các con tôm này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả cụ thể bằng các ví dụ được mô tả bên dưới, nhưng sáng chế không bị giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1: Ức chế sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH; SGP-G) trong tôm cái trưởng thành chân trắng

1. Sự sản xuất ARN chuỗi kép (ds-ARN) của gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng (VIH)

Sự tách dòng của gen VIH được thực hiện dựa trên trình tự (trình tự gen SGP-G) được báo cáo trong Tsutsui et al. (2013), Fish. Sci., 79: 357-365, nhờ đó điều chế plasmit. Plasmit đã điều chế được sử dụng làm khung, và vị trí VIH thành thực được khuếch đại sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu gen (T7-VIH-L, T7-VIH-R, xem bảng 1) liên kết với trình tự khởi động T7. Sản phẩm thu được được sử dụng làm khung để sản xuất VIH-dsARN sử dụng bộ kit iARN MEGAscript (Fig. 2). Trong số các trình tự được liệt kê trong bảng 1, trình tự được đại diện bởi TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO: 20) là trình tự của trình tự khởi động T7.

2. Việc sử dụng VIH-dsARN

Các cá thể tôm chân trắng trưởng thành cái (mỗi cá thể có khối lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 39 g đến 70 g) trong giai đoạn gian lột xác (giai đoạn C0-C1) được lựa chọn và sử dụng trong các thử nghiệm. VIH-dsARN đã sản xuất được hòa tan trong đệm TE(10 mM Tris-HCl độ pH = 7, EDTA 1 mM) (1

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$) và được tiêm với lượng 3 μg mỗi khối lượng cơ thể (g) (ô VIH-dsARN). Ngoài ra, để nghiên cứu tác dụng của đệm, đệm TE được tiêm với cùng một liều (3 μL) với mỗi khối lượng cơ thể (g) (ô đệm TE). dsARN (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) đối với gen protein huỳnh quang xanh lá cây (GFP), không tồn tại *in vivo* ở tôm, được tạo ra làm đối chứng âm, và nó được tiêm với lượng 3 μg với mỗi khối lượng cơ thể (g) (ô GFP-dsARN). Việc lấy mẫu từ mỗi ô thử nghiệm được tiến hành vào ngày 10 và 20 sau khi tiêm để thử nghiệm việc biểu hiện VIH trong cuống mắt. Ngoài ra, để thiết lập mức biểu hiện VIH *in vivo* ban đầu làm tiêu chuẩn, các cá thể tôm trưởng thành cái không được tiêm (ô ban đầu) cũng được lấy mẫu để kiểm tra sự biểu hiện của gen VIH trong cuống mắt. Lưu ý rằng các cá thể được lấy mẫu trong mỗi ô thử nghiệm được dán nhãn theo thứ tự của ô thử nghiệm, ngày lấy mẫu, và số tham chiếu. Đặc biệt là, các cá thể được lấy mẫu 10 ngày sau khi tiêm đệm TE (ô đệm TE) được gọi đơn giản là TE10-1 đến TE10-5, và các cá thể được lấy mẫu 20 ngày sau khi tiêm được gọi đơn giản là TE20-1 đến TE20-5.

3. Phân tích mức độ biểu hiện gen (tổng phần tách ARN, PCR bán định lượng, PCR định lượng)

ARN tổng được tinh chế từ mỗi cuống mắt được lấy làm mẫu sử dụng bộ kit nhỏ RNeasy (Qiagen) và bộ kit Clean-up (Qiagen). Trong một vài mẫu ARN tổng được tinh chế (TE10-3, TE10-4, VIH10-2), màu sắc còn lại được quan sát. ARN tổng được tinh chế được phiên mã ngược bằng ARN dung lượng cao đối với bộ kit cADN (hệ sinh học ứng dụng) để tổng hợp cADN. cADN đã tổng hợp được pha loãng 4 lần, và việc pha loãng được sử dụng làm khung để kiểm tra mức độ biểu hiện của gen VIH bằng PCR bán định lượng và PCR định lượng.

Trong PCR bán định lượng, để kiểm tra mức độ biểu hiện của gen cần quan tâm, PCR (biến chất tại 94°C trong 2 phút, sau đó 30 vòng ở 94°C trong 30 giây, 62°C trong 30 giây, và 72°C trong 30 giây) được thực hiện sử dụng đoạn mồi đặc hiệu (Liv-SGP-G-F:CGGAGTGCAGGAGCAACTG (SEQ ID NO: 21), Liv-R3:CCTCTCTGTGTCTTCTGGCCGTTGG (SEQ ID NO: 22))

cho gen VIH và TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x NoAmpErase UNG, hệ sinh học ứng dụng), nhờ đó phân tích mức độ biểu hiện. Ngoài ra, PCR được thực hiện theo cách tương tự sử dụng các đoạn mồi (Liv-act-Fw1:CGACCTCACAGACTACCTGATGAAGAT (SEQ ID NO: 23), Liv-act-Rv2:GTGGTCATCTCCTGCTCGAAG (SEQ ID NO: 24)) để khuếch tán gen beta-actin (ACTB) đóng vai trò làm gen tiêu chuẩn bên trong, tiếp theo là so sánh tương đối.

Trong PCR định lượng, ngoài kit và đoạn mồi đặc hiệu gen được mô tả nêu trên, đầu đọc (Liv-SGP-G-Prb:TCTACAACCCCGTGTTCGTCCAGTGC (SEQ ID NO: 25) cho VIH và Liv-act-Prb:CGACCACCGCCGAGCGAGAAATCGTTCGT (SEQ ID NO: 26) cho ACTB) được sử dụng để thực hiện PCR thời gian thực (hệ PCR thời gian thực nhanh 7500, hệ sinh học ứng dụng) trong các điều kiện sau: biến chất ở 95°C trong 2 phút, sau đó 40 vòng ở 95°C trong 10 giây và 62°C trong 30 giây. Mức độ biểu hiện của gen VIH được thu làm giá trị định lượng tương đối được tính toán dựa trên mức độ biểu hiện của gen cần quan tâm (VIH; SGP-G) đối với mức độ biểu hiện của gen tiêu chuẩn bên trong (ACTB).

4. Kết quả

Trong tổng số các mẫu ARN được tinh chế từ cuống mắt, màu sắc còn lại được quan sát trong mẫu ARN của TE10-3, TE10-4, VIH10-2. Sau khi PCR bán định lượng, bước điện di ADN được tiến hành để xác nhận. Kết quả là, gen tiêu chuẩn bên trong không được khuếch đại trong TE10-3 và TE10-4 (Fig. 3), và do đó, các kết quả bị loại khỏi phép phân tích mức độ biểu hiện gen. Mẫu VIH10-2 cho thấy sự gia tăng trong gen tiêu chuẩn bên trong. Tuy nhiên, vì màu sắc còn lại có thể cản trở sự khuếch đại của VIH, các kết quả được loại khỏi phép phân tích mức độ biểu hiện gen. Sau 30 vòng của PCR bán định lượng, sự biểu hiện VIH không được xác nhận ở các cá nhân của Ban đầu-2, GFP10-2, 5, TE20-1, và GFP20-5. Tuy nhiên, sự biểu hiện VIH được quan sát hoàn toàn trong ô ban đầu, ô đậm TE, và ô GFP-dsARN. Trong khí đó, ô thử

nghiệm của quá trình tiêm VIH-dsARN, sự biểu hiện VIH không được quan sát ở toàn bộ các cá thể trên ngày 10 và 20.

Ngoài ra, như được mô tả trong Fig. 4, các kết quả của PCR định lượng thể hiện rằng mức độ biểu hiện VIH không thay đổi đáng kể trong cả hai ngày 10 và 20 trong ô đậm TE và ô GFP-dsARN so với ô ban đầu trong khi mức độ biểu hiện VIH bị giảm đáng kể trong ô VIH-dsARN trong cả hai ngày 10 và 20. Như được mô tả trên đây, đã được chứng minh rằng sự biểu hiện gen VIH có thể ức chế trong tôm trưởng thành bằng cách tiêm VIH-dsARN.

Bảng 1

Danh sách đoạn mỗi đặc hiệu gen được sử dụng để can thiệp ARN

Gen đích	Tên oligo	Trình tự (5' đến 3')
GFP	T7-EGFP-2L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCATCGACTTCAAGGAGGAC (SEQ ID NO: 11)
GFP	T7-EGFP-2R	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGGGTGCTCAGGTAGTGGTT (SEQ ID NO: 12)
SGP-G	T7-VIH-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGCGAGCAAACCTTCGAC (SEQ ID NO: 13)
SGP-G	T7-VIH-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTACTTGCCACCGTCTG (SEQ ID NO: 14)
SGP-C/SGP-A	T7_sgpC-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTCGCTCTTCGACCCTTCC (SEQ ID NO: 15)
SGP-C	T7_sgpC-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTATTTCCCGACCATCTGG (SEQ ID NO: 16)
SGP-B	T7-sgpB-L2	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGCAGCATATCCTTCGACTCGT (SEQ ID NO: 17)
SGP-F	T7-sgpF-L	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGCGCTCCCTCTTCGACC (SEQ ID NO: 18)
SGP-F	T7-sgpF-R	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTTATTTGCCGACGGTCTGCAGG (SEQ ID NO: 19)
	Trình tự khởi động T7	TAATACGACTCACTATAGGG (SEQ ID NO: 20)

Ví dụ 2: Điều tiết sự biểu hiện gen VIH ở tôm cái gần trưởng thành chân trắng

1. Sự tách dòng peptit tuyến nút

Đối với tôm chân trắng, bảy peptit tuyến nút (peptit tuyến nút: SGP- A đến G) đã được xác định. Đã được báo cáo rằng trong số chúng, sáu peptit tuyến nút (A, B, C, E, F, G) có thể ức chế sự biểu hiện protein noãn hoàng (Tsutsui et al., 2007, Mar. Biotechnol., 9:360-369). Vì độ phong phú của SGP-G là lớn nhất, SGP-G đã được coi là VIH chính để nhắm đích trong các nghiên cứu tiếp theo. Tuy nhiên, khi được phát hiện rằng trình tự nucleotit của SGP-C có cấu trúc tương tự như của hormon tăng đường huyết của loài giáp xác (CHH) và SGP-C có tác động tương tự như của CHH, SGP-C đã được xác định là có các đặc tính của cả hai hormon (Lago-Leston et al., 2007, Aquaculture, 270: 343-357; Liu et al., 2014, Peptides, 53: 115-124). Theo sáng chế, mức độ biểu hiện VIH có thể ức chế thông qua việc tiêm *in vivo* của dsARN của không chỉ SGP-G (VIH) mà còn SGP-C và các gen SGP tương tự khác vào tôm. Vì những lý do như vậy, trình tự của SGP-C được thu từ thư viện cADN trong cuống mắt, và sự tách dòng cADN của SGP-A, SGP-B, và SGP-F được tiếp tục tiến hành.

2. Sản xuất dsARN của peptit tuyến nút

Như trong trường hợp tôm trưởng thành, một đoạn gen của vị trí VIH thành thực được khuếch đại bằng PCR dựa trên plasmit của gen VIH, và GFP-dsARN được sản xuất bằng bộ kit iARN MEGAscript sử dụng sản phẩm khuếch đại làm khung và VIH-dsARN làm đối chứng âm. Ngoài ra, như trong trường hợp VIH-dsARN, để tổng hợp dsARN gắn đích các vị trí thành thực của các gen SGP-A, SGP-B, SGP-C, và SGP-F, các đoạn gen được khuếch đại sử dụng đoạn mỗi đặc hiệu gen liên kết với trình tự khởi động T7 và đoạn mỗi trình tự khởi động T7 (xem bảng 1) bằng PCR sử dụng mỗi plasmit được tách dòng làm khung bằng phương pháp tương tự sử dụng cho VIH-dsARN, nhờ đó tổng hợp dsARN của mỗi gen. Do đó, GFP-dsARN, VIH-dsARN, và SGP-C-dsARN thu được được hòa tan trong đệm TE ở nồng độ 3 µg/4 µL để sử dụng. Ba dsARN, cụ thể là, SGP-A-dsARN, SGP-B-dsARN, và SGP-F-dsARN, được trộn sao cho nồng độ của mỗi dsARN được điều chỉnh đến 1 µg/4 µL. Sản phẩm thu được

được hòa tan trong đệm TE để thu được tổng nồng độ dsARN là 3 $\mu\text{g}/4 \mu\text{L}$ để sử dụng.

3. Việc sử dụng dsARN

VIH-dsARN được tiêm ở nồng độ là 3 μg với mỗi khối lượng cơ thể (g) vào các cá thể tôm gần trưởng thành cái được chọn ngẫu nhiên (mỗi con tôm có khối lượng cơ thể nằm trong khoảng từ 15 g đến 25 g) chỉ một lần (ô VIH-1) hoặc ba lần trong khoảng thời gian 7 ngày (ô VIH-2). SGP-C-dsARN được tiêm ở nồng độ là 3 μg với mỗi khối lượng cơ thể (g) chỉ một lần (ô SGP-C). SGP-A-dsARN, SGP-B-dsARN, và SGP-F-dsARN được trộn ở các nồng độ tương đương, và hỗn hợp được tiêm ở nồng độ là 3 μg với mỗi khối lượng cơ thể (g) chỉ một lần (ô Mix). GFP-dsARN được tiêm làm đối chứng âm ở nồng độ là 3 μg với mỗi khối lượng cơ thể (g) chỉ một lần (ô GFP). Việc lấy mẫu được tiến hành trong các ngày 10, 20, và 30 sau khi tiêm ban đầu, và mức độ biểu hiện VIH trong cuống mắt được kiểm tra.

4. Phân tích mức độ biểu hiện gen (tổng phân tách ARN, PCR bán định lượng, PCR định lượng)

Mức độ biểu hiện gen được phân tích theo cách tương tự như trong mục 3 ở ví dụ 1.

5. Kết quả

Gen SGP-C được tách dòng từ thư viện cADN ở cuống mắt được tìm thấy để mã hóa trình tự axit amin của 115 gốc, và cấu trúc chính của nó bao gồm peptit tín hiệu (24 gốc), CPRP (peptit liên quan đến tiền chất CHH; 16 gốc), và SGP-C thành thực (75 gốc) (Fig. 5). Ngoài ra, cADN được coi là tương ứng với các gen SGP-A, SGP-B, và SGP-F cũng được tách dòng thành công. Mỗi cADN được so sánh với trình tự peptit được tách trước đó từ cuống mắt. Trong trường hợp SGP-A, có sự thống nhất trong trình tự axit amin giả định của vị trí thành thực (Fig. 6), trong khi hai gốc axit amin khác nhau trong SGP-B (Fig. 7) và SGP-F (Fig. 8). Mỗi cADN này được sử dụng làm khung để tổng hợp dsARN

tương ứng. Trong các Fig. 2 và 5 đến 8, trình tự của mỗi đoạn mỗi dsARN được sử dụng để sản xuất dsARN được gạch chân kép. Mỗi đoạn mỗi được sử dụng để sản xuất dsARN để ức chế sự biểu hiện của gen peptit tuyến nút có liên quan. Trình tự dsARN đối với SGP-G trong Fig. 2 được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39, và trình tự của đoạn mỗi dsARN để sản xuất dsARN của SGP-G được chỉ ra trong SEQ ID NOS: 37 và 38. Trình tự dsARN đối với SGP-C trong Fig. 5 được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33, và trình tự của đoạn mỗi dsARN để sản xuất dsARN của SGP-C được chỉ ra trong SEQ ID NOS: 31 và 32. Trình tự dsARN đối với SGP-A trong Fig. 6 được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28, và trình tự của đoạn mỗi dsARN để sản xuất dsARN của SGP-A được chỉ ra trong SEQ ID NO: 27. Trình tự dsARN đối với SGP-B trong Fig. 7 được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30, và trình tự của đoạn mỗi dsARN để sản xuất dsARN của SGP-B được chỉ ra trong SEQ ID NO: 29. Trình tự dsARN đối với SGP-F trong Fig. 8 được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36, và trình tự của đoạn mỗi dsARN để sản xuất dsARN của SGP-F được chỉ ra trong SEQ ID NOS: 34 và 35.

Sự biểu hiện gen VIH trong cuống mắt sau đó tiêm dsARN được phân tích bằng PCR định lượng. Kết quả là, đối với ô ban đầu (không được tiêm), ô GFP trong đó GFP-dsARN được tiêm, không có sự giảm đáng kể trong mức độ biểu hiện VIH trong các ngày 10, 20, và 30. Tuy nhiên, trong ô VIH-1 (1 lần tiêm) và ô VIH-2 (3 lần tiêm) trong đó VIH-dsARN được tiêm, không có sự giảm đáng kể trong mức độ biểu hiện VIH trong các ngày 10, 20, và 30 sau khi tiêm (Fig. 9). Trong ô SGP-C trong đó dsARN của gen SGP-C tương tự được tiêm, mặc dù mức độ biểu hiện VIH giảm đáng kể trong ngày 10 sau khi tiêm, không có sự khác biệt đáng kể so với mức độ biểu hiện VIH của ô ban đầu trong các ngày 20 và 30. Ngoài ra, trong ô Mix trong đó hỗn hợp chứa dsARN của gen SGP-A, SGP-B, và SGP-F được tiêm, mặc dù mức độ biểu hiện VIH giảm đáng kể trong các ngày 10 và 30 sau khi tiêm, không có sự khác biệt đáng kể so với mức độ biểu hiện VIH của ô ban đầu trong ngày 20.

Như được mô tả trên đây, cũng có thể giảm đáng kể mức độ biểu hiện của gen VIH sử dụng dsARN của VIH (SGP-G) trong tôm gần trưởng thành. Ngoài ra, cũng có thể thu được tác dụng tương tự bằng cách sử dụng các gen VIH tương tự khác.

Khả năng ứng dụng công nghiệp

Tôm có thể được sản xuất theo cách có kế hoạch và hiệu quả bằng cách sử dụng dsARN theo sáng chế.

Danh sách trình tự

SEQ ID NO: 11-19, 21-27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, và 38 đối với các đoạn môi.

Toàn bộ các công bố, patent và đơn patent được trích dẫn trong bản mô tả này được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu tới chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm nuôi để được sử dụng làm tôm giống, bao gồm bước ức chế sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) ở tôm bằng cách can thiệp ARN sử dụng ARN chuỗi kép (dsARN) gắn đích mRNA của gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng ở tôm nuôi, trong đó gen hormon ức chế sự tạo noãn hoàng được chọn từ nhóm bao gồm peptit tuyến nút SGP-A, SGP-B, SGP-C, SGP-F, và SGP-G, trong đó dsARN có trình tự nucleotit giống với một phần của trình tự nucleotit của gen VIH, trong đó chuỗi có nghĩa có khả năng lai với gen này và chuỗi đối nghĩa có trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit của chuỗi có nghĩa được liên kết với nhau trong dsARN, và trong đó dsARN được chọn từ nhóm bao gồm: ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28 để gắn đích gen SGP-A; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30 để gắn đích gen SGP-B; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33 để gắn đích gen SGP-C; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36 để gắn đích gen SGP-F; và ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 để gắn đích gen SGP-G.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tôm nuôi là tôm thuộc họ *Penaeidae*.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó tôm nuôi là tôm chân trắng hoặc tôm he Nhật bản trưởng thành hoặc gần trưởng thành.

4. Chế phẩm giải phóng sự ức chế thành thực noãn bào ở tôm nuôi bằng cách ức chế sự biểu hiện của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) ở tôm, bao gồm ARN chuỗi kép (dsARN) gắn đích mRNA của gen hormon ức chế sự sinh noãn hoàng (VIH) được chọn từ nhóm bao gồm peptit tuyến nút SGP-A, SGP-B, SGP-C, SGP-F, và SGP-G, trong đó dsARN có trình tự nucleotit giống với một phần của trình tự nucleotit của gen VIH, và trong đó chuỗi có nghĩa có

khả năng lai với gen này và chuỗi đối nghĩa có trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit của chuỗi có nghĩa được liên kết với nhau trong dsARN, trong đó dsARN được chọn từ nhóm bao gồm: ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 28 để gắn đích gen SGP-A; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 30 để gắn đích gen SGP-B; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 33 để gắn đích gen SGP-C; ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 36 để gắn đích gen SGP-F; và ARN chuỗi kép (dsARN) có chuỗi có nghĩa chứa trình tự nucleotit được chỉ ra trong SEQ ID NO: 39 để gắn đích gen SGP-G

5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó tôm nuôi là tôm thuộc họ *Penaeidae*.

6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó tôm nuôi là tôm chân trắng hoặc tôm he Nhật bản trưởng thành hoặc gần trưởng thành.

Danh mục trình tự

<110> Trung tâm nghiên cứu khoa học nông nghiệp Nhật Bản

<120> PHƯƠNG PHÁP GIẢI PHÓNG SỰ ỨC CHẾ THÀNH THỰC NOĂN BÀO Ở TÔM NUÔI

<130> PH-7033-PCT

<150> JP 2016-214411

<151> 01-11-2016

<160> 39

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 364

<212> ADN

<213> Litopenaeus vannamei

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(356)

<400> 1

ttgcgtaa	ac t	atg ctt gcc tac	cgt act atg tgg tca	gcg ata atg gcc	50
		Met Leu Ala Tyr Arg Thr Met Trp Ser Ala Ile Met Ala			
	1		5	10	
tct ttg ctg ctg ctg ctc	gcg gcg tcg tcc gct gcc ccc gcc gac gcc	98			
Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser Ala Ala Pro Ala Asp Ala					
15	20	25			
tta tcc gcc cct gcg gca ggc ctc acc aaa cgc tcg cta ttc gac cct	146				
Leu Ser Ala Pro Ala Ala Gly Leu Thr Lys Arg Ser Leu Phe Asp Pro					
30	35	40	45		
tcc tgc agc ggc gtc ttc gac cgg cag ctc ttg cgg agg ctg cgt cga	194				
Ser Cys Ser Gly Val Phe Asp Arg Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg					
50	55	60			

gtg tgt gat gac tgt ttc aac gta ttt agg gaa ccc aac gta gct att 242
 Val Cys Asp Asp Cys Phe Asn Val Phe Arg Glu Pro Asn Val Ala Ile
 65 70 75

gat tgc agg gag aac tgt tac aac aac gaa gtg ttc cgc cag tgc atg 290
 Asp Cys Arg Glu Asn Cys Tyr Asn Asn Glu Val Phe Arg Gln Cys Met
 80 85 90

gca tac gtc gtt ccc gca aac ctc cac gac gaa cac agg caa gcc gtg 338
 Ala Tyr Val Val Pro Ala Asn Leu His Asp Glu His Arg Gln Ala Val
 95 100 105

cag atg gtc ggc aag taa actacttc 364
 Gln Met Val Gly Lys
 110

<210> 2
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Litopenaeus vannamei

<400> 2

Met Leu Ala Tyr Arg Thr Met Trp Ser Ala Ile Met Ala Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser Ala Ala Pro Ala Asp Ala Leu Ser Ala
 20 25 30

Pro Ala Ala Gly Leu Thr Lys Arg Ser Leu Phe Asp Pro Ser Cys Ser
 35 40 45

Gly Val Phe Asp Arg Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Val Cys Asp
 50 55 60

Asp Cys Phe Asn Val Phe Arg Glu Pro Asn Val Ala Ile Asp Cys Arg
 65 70 75 80

Glu Asn Cys Tyr Asn Asn Glu Val Phe Arg Gln Cys Met Ala Tyr Val
85 90 95

Val Pro Ala Asn Leu His Asp Glu His Arg Gln Ala Val Gln Met Val
100 105 110

Gly Lys

```
<210> 3
<211> 450
<212> ADN
<213> Litopenaeus vannamei
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (54) .. (449)
```

```
<400>   3  
gaagagcctc gaagtcgccg tctctectcc cgattcgagt cgacgccgag gaa atg           56  
                                         Met  
                                         1
```

att ggg gtt cga ctg gtg cgt tca gct gtc ctg gta tcc ctg ctg cta 104
Ile Gly Val Arg Leu Val Arg Ser Ala Val Leu Val Ser Leu Leu Leu
5 10 15

gtg ttc ccg gcc tct gtc ctc gcc tct tgg gac gga aat gaa atc cct 152
Val Phe Pro Ala Ser Val Leu Ala Ser Trp Asp Gly Asn Glu Ile Pro
20 25 30

ccg tcc ctg cct tcc tcc tca gaa tcc tct cct gcg acc ccc ctc gcg 200
Pro Ser Leu Pro Ser Ser Ser Glu Ser Ser Pro Ala Thr Pro Leu Ala
35 40 45

gga gcc cag acc gca aac aag cgc agc ata tcc ttc gac tcg tgc acg 248

Gly Ala Gln Thr Ala Asn Lys Arg Ser Ile Ser Phe Asp Ser Cys Thr
 50 55 60 65

ggc gtc tac gac cgc gaa ctc ctt gta agg ctc gac cgc gtg tgc gaa 296
 Gly Val Tyr Asp Arg Glu Leu Leu Val Arg Leu Asp Arg Val Cys Glu
 70 75 80

gac tgc tac aac ctg tac cgc gac acc gac gtg gcg gtc gaa tgc agg 344
 Asp Cys Tyr Asn Leu Tyr Arg Asp Thr Asp Val Ala Val Glu Cys Arg
 85 90 95

agc aac tgt ttc cac aac gag gta ttc ctg tac tgc gtc gac tac atg 392
 Ser Asn Cys Phe His Asn Glu Val Phe Leu Tyr Cys Val Asp Tyr Met
 100 105 110

tac cgg cct cgc caa agg aac cag tac cgg gcc gcc ctg cag agg ctc 440
 Tyr Arg Pro Arg Gln Arg Asn Gln Tyr Arg Ala Ala Leu Gln Arg Leu
 115 120 125

ggc aag tag g 450
 Gly Lys
 130

<210> 4
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> *Litopenaeus vannamei*

<400> 4

Met Ile Gly Val Arg Leu Val Arg Ser Ala Val Leu Val Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Phe Pro Ala Ser Val Leu Ala Ser Trp Asp Gly Asn Glu Ile
 20 25 30

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Ser Ser Glu Ser Ser Pro Ala Thr Pro Leu
 35 40 45

Ala Gly Ala Gln Thr Ala Asn Lys Arg Ser Ile Ser Phe Asp Ser Cys
 50 55 60

Thr Gly Val Tyr Asp Arg Glu Leu Leu Val Arg Leu Asp Arg Val Cys
 65 70 75 80

Glu Asp Cys Tyr Asn Leu Tyr Arg Asp Thr Asp Val Ala Val Glu Cys
 85 90 95

Arg Ser Asn Cys Phe His Asn Glu Val Phe Leu Tyr Cys Val Asp Tyr
 100 105 110

Met Tyr Arg Pro Arg Gln Arg Asn Gln Tyr Arg Ala Ala Leu Gln Arg
 115 120 125

Leu Gly Lys
 130

<210> 5
 <211> 833
 <212> ADN
 <213> Litopenaeus vannamei

<220>
 <221> CDS
 <222> (45)..(389)

<400> 5
 agtgccttca ccacatctaa aagccgttgt gatttacacg agct atg act gcc ttc 56
 Met Thr Ala Phe
 1

cgt atg gta tgg tca atg ttg ttg gct tct tta ctg ctg ctg ctc gcg 104
 Arg Met Val Trp Ser Met Leu Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Ala

5	10	15	20	
gcg tgc tcc gct gcc ccc gcc gac gcc tta tcc gcc cct gcg gca ggc				152
Ala Ser Ser Ala Ala Pro Ala Asp Ala Leu Ser Ala Pro Ala Ala Gly				
25	30	35		
ctc acc aaa cgc tgc ctc ttc gac cct tcc tgc acc ggc gtc ttc gac				200
Leu Thr Lys Arg Ser Leu Phe Asp Pro Ser Cys Thr Gly Val Phe Asp				
40	45	50		
cgg cag ctc ttg cgg agg ctg cgt cga gtg tgt gac gac tgt ttc aac				248
Arg Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Val Cys Asp Asp Cys Phe Asn				
55	60	65		
gta ttc agg gaa ccc aac gta tct act gaa tgc aga agt aac tgt tac				296
Val Phe Arg Glu Pro Asn Val Ser Thr Glu Cys Arg Ser Asn Cys Tyr				
70	75	80		
aac aat gaa gtg ttc cgc cag tgt atg gaa tac ctc ctc ccg cct cac				344
Asn Asn Glu Val Phe Arg Gln Cys Met Glu Tyr Leu Leu Pro Pro His				
85	90	95	100	
ctt cac gaa gag cac aga cta gct gtc cag atg gtc ggg aaa tag				389
Leu His Glu Glu His Arg Leu Ala Val Gln Met Val Gly Lys				
105	110			
atttacggtt aagacgctgc aaccacttc gctgacgaca ggaattcgat gatagtaaaa				449
ggcaccctaa ttccacttat tctacagcat agcactgagt cctcgatcgc tgtaacgaat				509
ggttttcaat gctgaagact tatactatga aatgaagctg acttccactc taagaaataa				569
gaatgaaagg gtgcagtttg ccattatatt gggactatca tgacacattt agttcggcca				629
ctgatcacag tatagaaaat atatatacac atgaacgcca tttatcagga aactggagaa				689
aaaatatcac tgaaagagat tgttcttagg actcgaggct ttaattaaca ttagaatagg				749
tatttgtgat gttttattat gtttaaattt acgaataaag cactggcatg ctaaaaaaaa				809
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa				833

<210> 6
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Litopenaeus vannamei

<400> 6

Met Thr Ala Phe Arg Met Val Trp Ser Met Leu Leu Ala Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser Ala Ala Pro Ala Asp Ala Leu Ser Ala
 20 25 30

Pro Ala Ala Gly Leu Thr Lys Arg Ser Leu Phe Asp Pro Ser Cys Thr
 35 40 45

Gly Val Phe Asp Arg Gln Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg Val Cys Asp
 50 55 60

Asp Cys Phe Asn Val Phe Arg Glu Pro Asn Val Ser Thr Glu Cys Arg
 65 70 75 80

Ser Asn Cys Tyr Asn Asn Glu Val Phe Arg Gln Cys Met Glu Tyr Leu
 85 90 95

Leu Pro Pro His Leu His Glu Glu His Arg Leu Ala Val Gln Met Val
 100 105 110

Gly Lys

<210> 7
 <211> 404

<212> ADN

<213> Litopenaeus vannamei

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(402)

<400> 7

gaaaggacct cgttgcaatt gagtatttcg agtttcgcgt catttaca atg gta ctt 57
 Met Val Leu
 1

caa tac atg ctg tct gcg gcc ctg ctg gtg ctc gcc gcc tcg tcc tcg 105
 Gln Tyr Met Leu Ser Ala Ala Leu Leu Val Leu Ala Ala Ser Ser Ser
 5 10 15

ccc gcc gcc gcc cgc tcc ctc gac gcg gcg cct tcg tct gcg tcc tca 153
 Pro Ala Ala Ala Arg Ser Leu Asp Ala Ala Pro Ser Ser Ala Ser Ser
 20 25 30 35

gga agc cac agc ctc agc aag cgc tcc ctc ttc gac ccg gcg tgc acc 201
 Gly Ser His Ser Leu Ser Lys Arg Ser Leu Phe Asp Pro Ala Cys Thr
 40 45 50

ggc atc tac gac cgg cag ctg ctg ggc aag ctg ggg cgc ctg tgc gac 249
 Gly Ile Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Gly Lys Leu Gly Arg Leu Cys Asp
 55 60 65

gac tgc tac aac gtg ttc cgg gag ccc aag gtg gcc acg gga tgc agg 297
 Asp Cys Tyr Asn Val Phe Arg Glu Pro Lys Val Ala Thr Gly Cys Arg
 70 75 80

agt aac tgc tac tac aac ctc atc ttc ctc gac tgc ctc gag tac ctg 345
 Ser Asn Cys Tyr Tyr Asn Leu Ile Phe Leu Asp Cys Leu Glu Tyr Leu
 85 90 95

atc ccg agc cac ctt cag gag gag cac atg tcg gcc ctg cag acc gtc 393
 Ile Pro Ser His Leu Gln Glu Glu His Met Ser Ala Leu Gln Thr Val
 100 105 110 115

ggc aaa taa ag 404

Gly Lys

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Litopenaeus vannamei

<400> 8

Met Val Leu Gln Tyr Met Leu Ser Ala Ala Leu Leu Val Leu Ala Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Pro Ala Ala Ala Arg Ser Leu Asp Ala Ala Pro Ser Ser
20 25 30

Ala Ser Ser Gly Ser His Ser Leu Ser Lys Arg Ser Leu Phe Asp Pro
35 40 45

Ala Cys Thr Gly Ile Tyr Asp Arg Gln Leu Leu Gly Lys Leu Gly Arg
50 55 60

Leu Cys Asp Asp Cys Tyr Asn Val Phe Arg Glu Pro Lys Val Ala Thr
65 70 75 80

Gly Cys Arg Ser Asn Cys Tyr Tyr Asn Leu Ile Phe Leu Asp Cys Leu
85 90 95

Glu Tyr Leu Ile Pro Ser His Leu Gln Glu Glu His Met Ser Ala Leu
100 105 110

Gln Thr Val Gly Lys
115

<210> 9
 <211> 587
 <212> ADN
 <213> Litopenaeus vannamei

<220>
 <221> CDS
 <222> (60)..(416)

<400> 9
 ggtcgcagtc acagtcgcca gctgctcata ctctgaactc ttgacacaga ctgctcgcc 59

 atg aca gcc ttt cgc ttg atg gcc gtg gcc ctg gtg gtg gtc gtg gcg 107
 Met Thr Ala Phe Arg Leu Met Ala Val Ala Leu Val Val Val Val Ala
 1 5 10 15

 tgc tcg acg acc tgg gct cgc tcc gcc gag ggg tcg tcg tcc ccc gtg 155
 Cys Ser Thr Thr Trp Ala Arg Ser Ala Glu Gly Ser Ser Ser Pro Val
 20 25 30

 gcc tcc ctc atc agg ggc cgc agc ctc agc aag cga gca aac ttc gac 203
 Ala Ser Leu Ile Arg Gly Arg Ser Leu Ser Lys Arg Ala Asn Phe Asp
 35 40 45

 cct tcc tgc acg ggc gtc tac gac cgg gag ctc ctg ggg agg ctg agc 251
 Pro Ser Cys Thr Gly Val Tyr Asp Arg Glu Leu Leu Gly Arg Leu Ser
 50 55 60

 cgc ctc tgc gac gac tgc tac aac gtg ttt cgc gag ccc aag gtg gcc 299
 Arg Leu Cys Asp Asp Cys Tyr Asn Val Phe Arg Glu Pro Lys Val Ala
 65 70 75 80

 acg gag tgc agg agc aac tgc ttc tac aac ccc gtg ttc gtc cag tgc 347
 Thr Glu Cys Arg Ser Asn Cys Phe Tyr Asn Pro Val Phe Val Gln Cys
 85 90 95

 ctg gag tac ctg att ccg gcc gac ctg cac gag gag tac caa gcc ctc 395
 Leu Glu Tyr Leu Ile Pro Ala Asp Leu His Glu Glu Tyr Gln Ala Leu
 100 105 110

gtg cag acg gtg ggc aag tag gctcgctcga cctgccacgg cctcgccctcg 446
 Val Gln Thr Val Gly Lys
 115

cgcactcacg ccaacggccg gaagacacag agaggatttc aggatttggt tctggctaac 506

tgggtgtatTT catcgaccct gctcggattt tgatatgatt tctcatgtcc taaattgtga 566

tgaatctcta aatgaagtgt g 587

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Litopenaeus vannamei

<400> 10

Met Thr Ala Phe Arg Leu Met Ala Val Ala Leu Val Val Val Val Ala
 1 5 10 15

Cys Ser Thr Thr Trp Ala Arg Ser Ala Glu Gly Ser Ser Ser Pro Val
 20 25 30

Ala Ser Leu Ile Arg Gly Arg Ser Leu Ser Lys Arg Ala Asn Phe Asp
 35 40 45

Pro Ser Cys Thr Gly Val Tyr Asp Arg Glu Leu Leu Gly Arg Leu Ser
 50 55 60

Arg Leu Cys Asp Asp Cys Tyr Asn Val Phe Arg Glu Pro Lys Val Ala
 65 70 75 80

Thr Glu Cys Arg Ser Asn Cys Phe Tyr Asn Pro Val Phe Val Gln Cys
 85 90 95

Leu Glu Tyr Leu Ile Pro Ala Asp Leu His Glu Glu Tyr Gln Ala Leu
 100 105 110

Val Gln Thr Val Gly Lys
 115

<210> 11
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 11
 taatacgact cactataggg agagcatcga cttcaaggag gac

43

<210> 12
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 12
 taatacgact cactataggg agatgggtgc tcaggtagtg gtt

43

<210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 13
 taatacgact cactataggg agaaagcgag caaacttcga c

41

<210> 14

<211> 41

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 14

taatacgact cactataggg agactacttg cccaccgtct g

41

<210> 15

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 15

taatacgact cactataggg agactcgctc ttcgaccctt cc

42

<210> 16

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 16

taatacgact cactataggg agactatttc ccgaccatct gg

42

<210> 17

<211> 45

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mới

<400> 17

taatacgact cactataggg agacgcagca tatccttcga ctcg

45

<210> 18

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mới

<400> 18

taatacgact cactataggg agaaagcgct ccctcttcga cc

42

<210> 19

<211> 47

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mới

<400> 19

taatacgact cactataggg agactttatt tgccgacggt ctgcagg

47

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mới

<400> 20

taatacgact cactataggg

20

<210> 21

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 21

cggagtgcag gagcaactg

19

<210> 22

<211> 25

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 22

cctctctgtg tcttctggcc gttgg

25

<210> 23

<211> 27

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 23

cgacctcaca gactacctga tgaagat

27

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 24

gtggatcatct cctgctcgaa g

21

<210> 25

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 25

tctacaaccc cgtgttcgtc cagtgc

26

<210> 26

<211> 29

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 26

cgaccaccgc cgagcgagaa atcgttcgt

29

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 27

ctcgctattc gacccttcc

19

<210> 28
 <211> 234
 <212> ADN
 <213> Litopenaeus vannamei

<400> 28
 ctcgctattc gacccttcct gcagcggcgt cttcgaccgg cagctcttgc ggaggctgcg 60
 tcgagtgtgt gatgactgtt tcaacgtatt tagggaaccc aacgtagcta ttgattgcag 120
 ggagaactgt tacaacaacg aagtgttccg ccagtgcatt gcatacgtcg ttcccgcaaa 180
 cctccacgac gaacacaggg aagccgtgca gatggtcggc aagtaaacta cttc 234

<210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 29
 cgcagcatat ccttcgactc gt 22

<210> 30
 <211> 229
 <212> ADN
 <213> Litopenaeus vannamei

<400> 30
 cgcagcatat ccttcgactc gtgcacgggc gtctacgacc gcgaactcct tgtaaggctc 60
 gaccgcgtgt gcgaagactg ctacaacctg taccgcgaca ccgacgtggc ggtcgaatgc 120
 aggagcaact gtttccacaa cgaggtattc ctgtactgcg tcgactacat gtaccggcct 180
 cgccaaagga accagtaccg ggccgccctg cagaggctcg gcaagtagg 229

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 31
 ctcgctcttc gacccttcct 20

<210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 32
 ccagatgggc gggaaatag 19

<210> 33
 <211> 226
 <212> ADN
 <213> Litopenaeus vannamei

<400> 33
 ctcgctcttc gacccttcct gcaccggcgt cttcgaccgg cagctcttgc ggaggctgcg 60
 tcgagtgtgt gacgactgtt tcaacgtatt cagggaaccc aacgtatcta ctgaatgcag 120
 aagtaactgt tacaacaatg aagtgttccg ccagtgtatg gaatacctcc tcccgcctca 180
 ccttcacgaa gagcacagac tagctgtcca gatggtcggg aaatag 226

<210> 34

<211> 19

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 34

aagcgcctccc tcttcgacc

19

<210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 35

cctgcagacc gtcggcaaata aaag

24

<210> 36

<211> 233

<212> ADN

<213> Litopenaeus vannamei

<400> 36

aagcgcctccc tcttcgaccc ggcgtgcacc ggcattctacg accggcagct gctgggcaag

60

ctggggcgcc tgtgcgacga ctgctacaac gtgttccggg agcccaaggt ggccacggga

120

tgcaggagta actgctacta caacctcatc ttctctgact gcctcgagta cctgatcccg

180

agccaccttc aggaggagca catgtcggcc ctgcagaccg tcggcaaata aag

233

<210> 37

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 37

aagcgagcaa acttcgac

18

<210> 38

<211> 18

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 38

cagacggtgg gcaagtag

18

<210> 39

<211> 231

<212> ADN

<213> Litopenaeus vannamei

<400> 39

aagcgagcaa acttcgaccc ttctgcacg ggcgtctacg accgggagct cctggggagg

60

ctgagccgcc tctgcgacga ctgctacaac gtgtttcgcg agcccaaggt ggccacggag

120

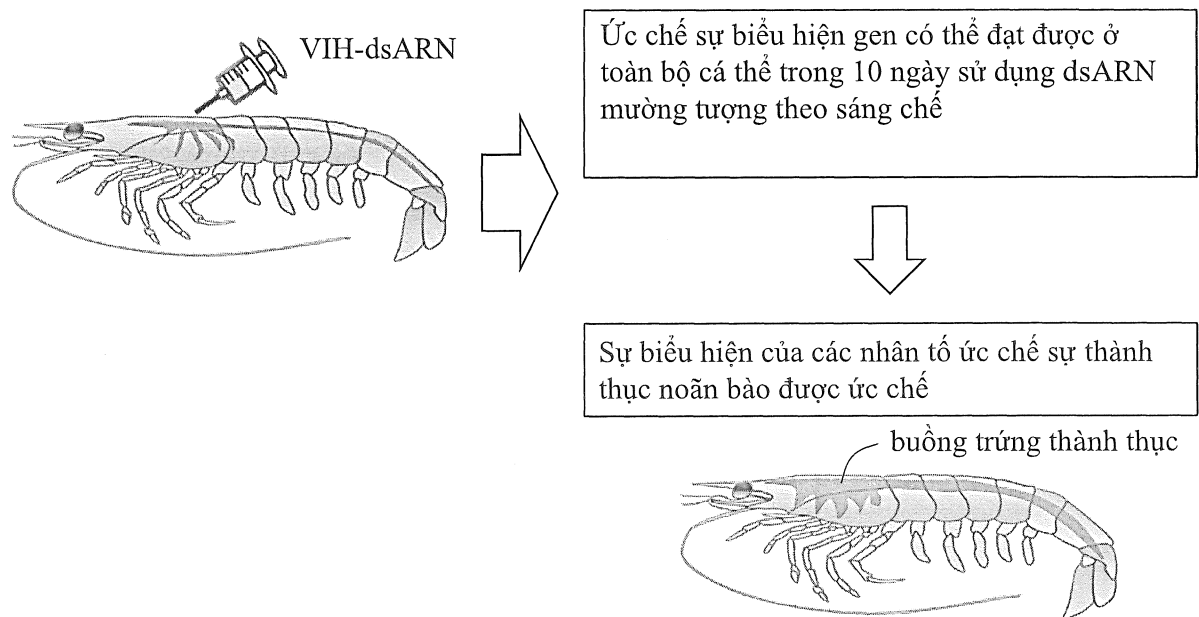
tgcaggagca actgcttcta caaccccgctg ttcgtccagt gcctggagta cctgattccg

180

gccgacctgc acgaggagta ccaagccctc gtgcagacgg tgggcaagta g

231

Fig. 1



peptit tín hiệu

GGTCGCAGTCACTGCGCCAGCTGTCTATACTCTGAACACTTTGACACAGACTGCTCGCCA : 60 M
TGACAGCCTTTCGCTTGATGCCCGTGGCCCCTGGTGGTGGTCTGCGACGACCT : 120
T A F R L M A V A L V V V V A C S T T W
CPRP
▼
GGGCTCGCTCCGCCGAGGGGTGCTGTCCTCCCCCGTGGCCTCCCTCATCAGGGGCCGACGCC : 180
A R S A E G S S P V A S I R G R S L
VIIH thành thực
▼
TCAGCAAGCGAGCAAACTTCGACCCTTCCTGCACGGGGCTCTACGACCGGGAGCTCCTGG : 240
S K R A N F D P S C T G V Y D R E L L G
GGAGGCTGAGCCGCCTCTGCGACGACTGCTACAACGTGTTTCGCGAGCCCAAGGTGGCCA : 300
R L S R L C D D C Y N V F R E P K V A T
CGGAGTGCAGGAGCAACTGCTTCTACAACCCCGTGTTCGTCCAGTGCCTGGAGTACCTGA : 360
E C R S N C F Y N P V F V Q C L E Y L I
TTCCGGCCGACCTGCACGAGGAGTAGCAAGCCCTCGTGCAGACGGTGGCAAGTAGGCTC : 420
P A D L H E E Y Q A L V Q T V G K *
GCTCGACCTGCCACGGCCTCGCCTCGCGCACTCACGCCAACGGCCGGAAGACACAGAGAG : 480
GATTTCAGGATTGTCTCGCTAACTGGTGTATTTCATCGACCCCTGCTCGGATTGTGAT : 540
ATGATTCTCATGTCTCTAAATTGTGATGAATCTCTAAATGAAAGTGT : 580

Fig. 3

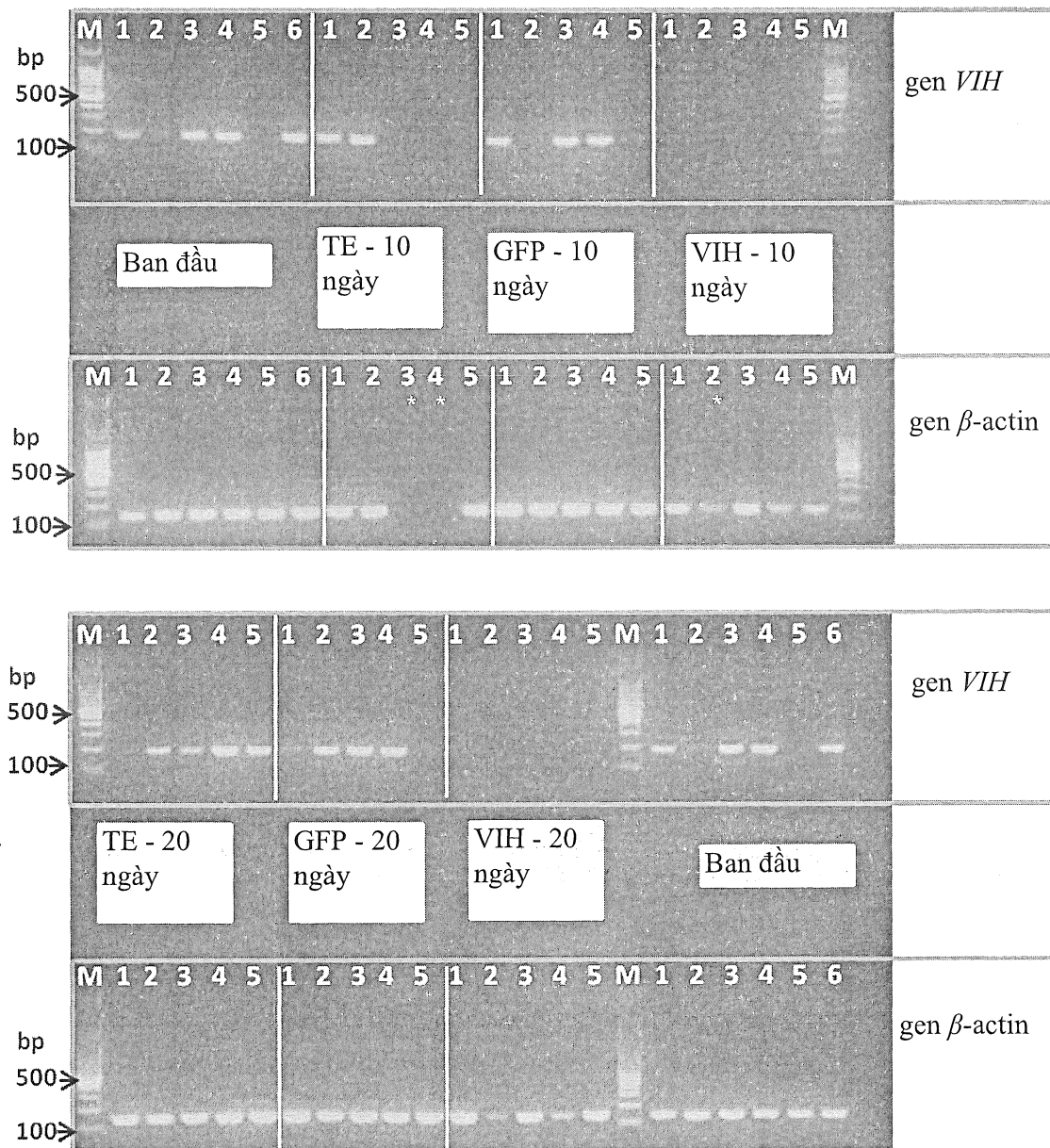


Fig. 4

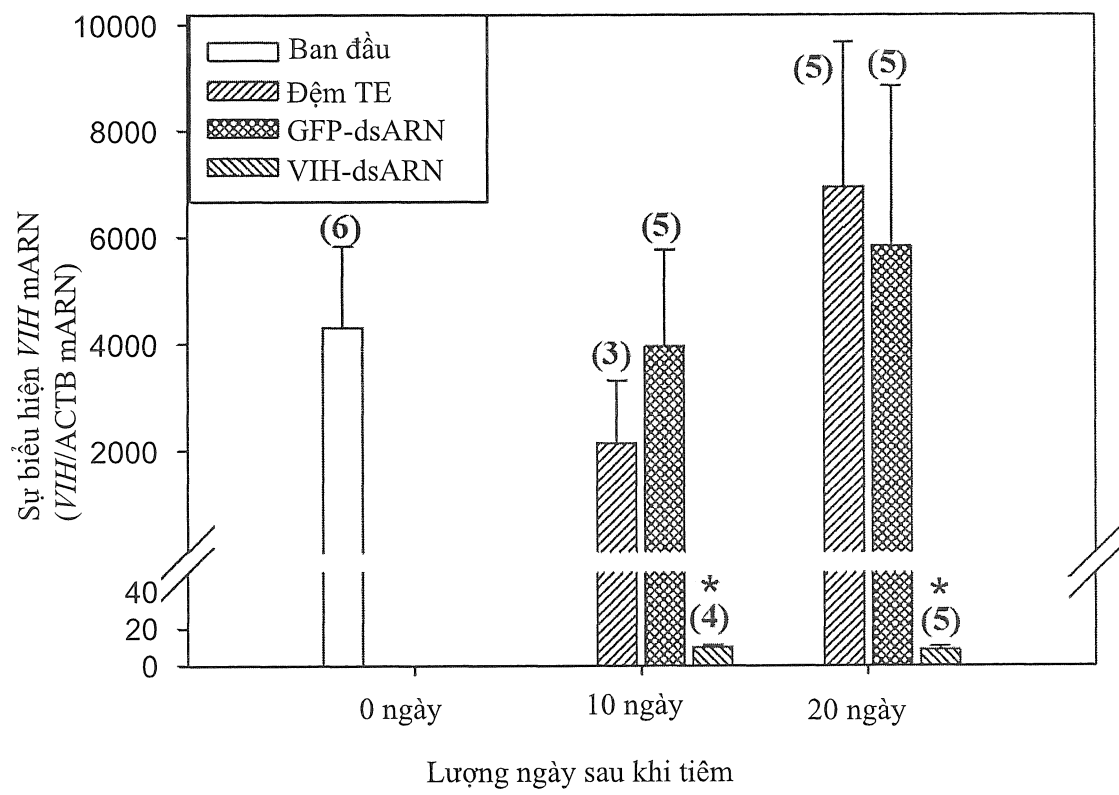


Fig. 5

```

1  AGTGCCCTTACCACATCTAAAGCCGTTGTGATTTACACGAGCTATGACTGCCCTTCCGTATGGTCAATGTTGTTG : 80
      M T A F R M V W S M L L
      ↓
      peptit tín hiệu      ↓      CPRP
      GCTTCTTACTGCTGCTCGCGGCTCGTCCGCTGCCCGCCGACGCCCTTATCCGCCCTGCGGAGGCTCGAGTGTGACGACT :160
13  A S L L L L A A S S A A P A D A L S A P A A G L T K
      ↓
      SPG-C thành thực
      ACGTCGCTCTTCGACCCCTTCCTTGCACCGGCGTCTTCGACCGGCAGCTCTTGGGAGGCTCGTGCAGTGTGACGACT :240
40  R S L F D P S C T G V F D R Q L L R R L R R V C D D C
      ↓
      GTTCAAACGTATTCAGGGAAACCCAAACGTATCTACTGAATGCAGAAGTAACTGTTACAACAATGAAGTGTCCGCCAGTGT :320
67  F N V F R E P N V S T E C R S N C Y N N E V F R Q C
      ↓
      ATGGAATACCTCCTCCCGCCTCACCTTCACGAAGAGCACAGACTAGCTGTCCAGATGGTCGGGAAAATAGATTTACGGTTA :400
93  M E Y L L P P H L H E E H R L A V Q M V G K *
      ↓
      AGACGCTGCAACCCACTTCGCTGACGACAGGAATTCGATGATAGTAAAGGCACCCCTAATTCACCTTATTCTACAGCATA :480
      GCACTGAGTCCTCGATCGCTGTAAACGAATGGTTTCAATGCTGAAGACTTATCTATGAAATGAAGCTGACTTCCACTCT :560
      AAGAAAATAAGAAATGAAAGGTGCAGTTTGCCATTATATTGGGACTATCATGACACATTTAGTTCGGCCACTGATCACAGT :640
      ATAGAAAATATATATACACATGAACGCCATTTATCAGGAAACTGGAGAAAAAATATCACTGAAAGAGATTGTTCTTAGGA :720
      CTCGAGGCTTTAATTAAACATTAGAAATAGGTATTTGTGATGTTTATTATGTTTAAATTACGAATAAAGCACTGGCATGC :800
      TAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
  
```

trình tự nucleotit : SEQ ID NO: 5
trình tự axit amin : SEQ ID NO: 6

Fig. 6

TTGCGTAAACTATGCTTGCCCTACCGTACTATGTGGTCAGCGATAATGGCCCTCTTTGCTGCTGCTCGCGGGCGTCGTCC : 80
M L A Y R T M W S A I M A S L L L L A A S S

↓ SPG-A thành thực

GCTGCCCCCGCGACGCCCTTATCCGCCCCCTGCGGCAGGCCCTCACCCAAACGCTCGCTATTCGACCCCTTCCTGCAGCGGCGT : 160
A A P A D A L S A P A A G L T K R S L F D P S C S G V

CTTCGACCGGCAGCTCTTGCGGAGGCTGCGTCGAGTGTGTGATGACTGTTCAACGTAATTAGGGAACCCAAACGTAGCTA : 240
F D R Q L L R R L R R V C D D C F N V F R E P N V A I

TTGATTGCAGGGAGAACTGTTACAACAACGAAGTGTCCGCCAGTGCATGCGTACGTCTCCCGCAAACCTCCACGAC : 320
D C R E N C Y N N E V F R Q C M A Y V V P A N L H D

GAACACAGGCAAGCCGTGCAGATGGTCGGCAAGTAAACTACTTC
E H R Q A V Q M V G K *

trình tự nucleotit : SEQ ID NO: 1
trình tự axit amin : SEQ ID NO: 2

Fig. 7

GAAGAGCCCTCGAAGTCGCCGTCTCTCCTCCCGATTTCGAGTCGACGCCGAGGAAATGATTGGGGTTCGACTGGTGC GTTCA : 80
M I G V R L V R S

GCTGTCCCTGGTATCCCTGTGCTAGTGTTCCTGGGCCCTCTGTCTCGCCCTCTTGGGACGGAAATGAAATCCCTCCGTCCCT :160
A V L V S L L L V F P A S V L A S W D G N E I P P S L

GCCTTCCTCCTCAGAAATCCTCTCCTGCGACCCCTCTCGGGGAGCCCGACCGCAACAAAGCGCAGCATATCCTTCGACT :240
P S S S E S S P A T P L A G A Q T A N K R S I S F D S
↓ SPG-B thành thực

CGTGACGGCGTCTACGACCGCGAACTCCTTGTAAGGCTCGACCGCGTGTCGGAAGACTGCTACAACTGTACCGCGAC :320
C T G V Y D R E L L V R L D R V C E D C Y N L Y R D

ACCGACGTGGCGGTGGAATGCAGGAGCAACTGTTTCCACAACGAGGTATTCCCTGTACTGCGTCGACTACATGTACCGGCC :400
T D V A V E C R S N C F H N E V F L Y C V D Y M Y R P

TCGCCAAAGGAACCAAGTACCGGGCCCTGCAGAGGCTCGGCAAGTAGG
R Q R N Q Y R A A L Q R L G K *
trình tự nucleotit : SEQ ID NO: 3
trình tự axit amin : SEQ ID NO: 4

Fig. 8

GAAAGGACCTCGTTGCAATTGAGTATTTGAGTTTCGGCTCATTTACAATGGTACTTCAATACATGCTGCTGCGGCCCT : 80
M V L Q Y M L S A A L

GCTGGTGCCTCGCCGCTCGCCGCGCCGCTCCCTCGACGGCGCCTTCGTCTGCGTCCCTCAGGAAGCC :160
L V L A A S S S P A A A R S L D A A P S S A S S G S H

↓ SPG-F thành thực

ACAGCCTCAGCAAGCGTCCCTCTTCGACCCGGCGTGACCGGCATCTACGACCGCAGCTGTCGGCAAGCTGGGGCGC : 240

S L S K R S L F D P A C T G I Y D R Q L L G K L G R

CTGTGGCAGCACTGCTACAACGTGTTCCGGGAGCCCAAGGTGGCCACGGGATGCAGGAGTAAGTCTACTACAACCTCAT : 320
L C D D C Y N V F R E P K V A T G C R S N C Y Y N L I

CTTCCCTCGACTGCCTCGAGTACCTGATCCCGAGCCACCTTCAGGAGGACATGTCGCCCTGCAGACCGTCGCAAT : 400

trình tự nucleotit : SEQ ID NO: 7

trình tự axit amin : SEQ ID NO: 8

AAAG

Fig. 9

