



(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)



1-0036966

(51)⁷ C07K 16/08; A23K 20/195; A61K (13) B
39/00; C07K 16/02; A23K 20/147;
A23K 50/80

(21) 1-2018-04544

(22) 12/10/2018

(30) 10-2018-0088344 30/07/2018 KR

(45) 25/09/2023 426

(43) 25/02/2020 383A

(73) ADbiotech Co., Ltd (KR)

39, Geodudanji 1-gil, Dongnae-myeon, Chuncheon-si, Gangwon-do, Republic of Korea (Postal code: 24398)

(72) CHEONG, Hong Gul (KR); KWON, Hyuck Se (KR); KIM, Su Yeun (KR); YANG, Song Yi (KR).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT KHÁNG THỂ LÒNG ĐỎ TRÚNG ĐỂ NGĂN NGỪA TÔM CHẾT

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ được cấy kháng nguyên đối với hội chứng tôm chết sớm và virus gây hội chứng đốm trắng, và công nghệ ứng dụng nó. Kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng thu được từ gà mái đẻ được tạo miễn dịch bằng cách cho gà mái đẻ này cấy kháng nguyên đối với hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng, nhờ đó hữu ích làm chế phẩm để ngăn ngừa tôm chết và thức ăn hoặc phụ gia thức ăn. Kháng thể này có tác dụng hiệp đồng (nâng cao) do cấu tạo của kháng nguyên đối với khuẩn phẩy bacillus và virus gây hội chứng đốm trắng, là sinh vật gây ra hội chứng tôm chết sớm, vì thế biểu hiện độ chuẩn kháng thể tuyệt vời. Kháng thể được tạo ra từ gà mái đẻ, vì thế có độ ổn định tuyệt vời và được tạo ra tương đối dễ dàng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đối với virus gây hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng, và việc sử dụng của nó. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ được cấy kháng nguyên đối với virus gây hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng, và công nghệ ứng dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện nay, gia tăng nhanh mối quan tâm trên toàn thế giới trong việc cải thiện thói quen ăn uống để ngăn ngừa các bệnh ở người lớn. Do đó, nhu cầu về sản phẩm thủy sản đã được tăng lên một cách ổn định, vì thế tăng nhanh sản lượng thủy sản nuôi trồng. Vì thế, công nghiệp nuôi trồng thủy sản đã trở thành công cụ kinh tế chính ở nhiều nước, và sự xuất hiện dịch bệnh ở thủy sản nuôi có tác động lớn đến sự phát triển kinh tế.

Khuẩn phẩy *bacillus* và virus gây hội chứng đốm trắng được biết đến là nguyên nhân chính gây bệnh ở tôm, trong số các thủy sản nuôi trồng. Khuẩn phẩy *bacillus* (giống *Vibrio*) là bacillus gram âm, có một roi phân cực hoặc, ở một số loài, hai hoặc nhiều roi phân cực ở một đầu của nó và dịch chuyển một cách tích cực, và thể gây bệnh tiêu biểu của nó là *Vibrio cholerae*, gây bệnh dịch tả. Có *Vibrio parahaemolyticus*, được gọi là khuẩn phẩy gây viêm ruột, *Vibrio harveyi*, và *Vibrio anguillarum*, gây ra bệnh ở tôm. Khi tôm bị nhiễm bacillus nêu trên, chúng chết trong vòng từ 24 đến 72 giờ.

Virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV) là dạng bao gồm phần gắn giống đuôi, vỏ protein giống que, và vỏ bao. Khi tôm bị nhiễm virus gây hội chứng đốm trắng, các đốm trắng xuất hiện trên giáp, phần phụ, và lớp biểu bì của tôm, gan tụy chuyển màu đỏ, và chúng chết trong 3 đến 5 ngày sau khi nhiễm.

Do đó, kháng thể noãn hoàng (IgY) đang nổi lên như một trong các biện pháp để ngăn ngừa và chữa các bệnh ở tôm. Kháng thể noãn hoàng là dạng miễn dịch chủ động sử dụng hệ miễn dịch của loài chim. Kháng thể miễn dịch có được nhờ miễn dịch chủ động của gà mẹ

được chuyển vào lòng đỏ của trứng, vì thế miễn dịch được truyền sang con. Kháng thể noãn hoàng đã được chứng minh là hữu hiệu trong việc ngăn ngừa và chữa bệnh trong các nghiên cứu khác nhau. Đã được báo cáo rằng, khi kháng thể noãn hoàng được sử dụng ở nồng độ cao, tác dụng điều trị bệnh của nó có thể được mong đợi là gần như giống tác dụng của kháng sinh. Hơn nữa, do kháng thể noãn hoàng thu được từ trứng, là thực phẩm toàn phần, kháng thể noãn hoàng có thể là chất rất hữu ích mà không có bất kỳ lo lắng gì về độ an toàn.

Tài liệu ưu tiên

Tài liệu patent

Tài liệu patent 0001: Patent Hàn Quốc số 10-1242821

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

1. Vấn đề kỹ thuật

Sáng chế đã được thực hiện để lưu ý các vấn đề trên xảy ra trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, và mục đích của sáng chế là đề xuất kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng thu được từ gà mái đẻ được tạo miễn dịch bằng cách cho gà mái đẻ này cấy kháng nguyên đối với hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng, và chế phẩm ngăn ngừa tôm chết, thức ăn hoặc phụ gia thức ăn, phương pháp ngăn ngừa bệnh, và phương pháp nuôi tôm sử dụng kháng nguyên này.

* Dự án liên quan đến đơn ưu tiên tại Hàn Quốc

Dự án số: N0002406

Tên cơ quan chính phủ: Bộ Thương Mại, Công nghiệp và Năng lượng Hàn Quốc

Viện chuyên môn quản lý dự án: Viện Công nghệ tiên tiến Hàn Quốc

Tên công việc: Nghiên cứu và phát triển kinh doanh (R&BD)

Tên dự án: Phát triển phụ gia thức ăn sử dụng protein miễn dịch đặc hiệu nhằm ngăn ngừa bệnh lây nhiễm gây chết sớm ở tôm nuôi cấy và nhằm thúc đẩy sự phát triển của tôm nuôi cấy

Tỷ lệ đóng góp: 100%

Tổ chức thi hành: ADbiotech Co., Ltd.

Thời gian: 01/04/ 2017 đến 31/12/ 2018

2. Giải pháp kỹ thuật

Để hoàn thành mục đích trên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể để ngăn ngừa tôm chết. Phương pháp này bao gồm các bước (a) tạo miễn dịch cho gà mái đẻ bằng cách cho gà mái đẻ này cấy kháng nguyên bao gồm khuẩn phẩy bacillus (giống *Vibrio*) và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV), là sinh vật gây ra hội chứng tôm chết sớm, (b) khiến cho gà mái đẻ đã được tạo miễn dịch có thể đẻ trứng, và (c) tách kháng thể này khỏi lòng đỏ của trứng được đẻ ra.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể để ngăn ngừa tôm chết. Phương pháp này bao gồm các bước (a) tạo miễn dịch cho gà mái đẻ bằng cách cho gà mái đẻ này cấy kháng nguyên bao gồm khuẩn phẩy bacillus (giống *Vibrio*) và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV), là sinh vật gây ra hội chứng tôm chết sớm, và protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của khuẩn phẩy bacillus, (b) khiến cho gà mái đẻ đã được tạo miễn dịch có thể đẻ trứng, và (c) tách kháng thể này ra khỏi lòng đỏ của trứng được đẻ ra.

Khuẩn phẩy bacillus có thể bao gồm *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, và *Vibrio anguillarum*.

Vibrio parahaemolyticus, *Vibrio harveyi*, và *Vibrio anguillarum* có thể được trộn ở tỷ lệ bằng 0,5 đến 1,5 : 0,5 đến 1,5 : 0,3 đến 1,0, tốt hơn là 0,7 đến 1,3 : 0,7 đến 1,3 : 0,4 đến 0,7, và tốt hơn nữa là 1,0 : 1,0 : 0,5.

Protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng có thể là VP28.

Protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của khuẩn phẩy bacillus có thể là OmpW (protein màng ngoài W của *Vibrio parahaemolyticus*) và OmpK (protein màng ngoài K của *Vibrio harveyi*).

Theo sáng chế, OmpW và OmpK có thể được biểu hiện dưới dạng V1W và VbK, tương ứng.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể để ngăn ngừa tôm chết, được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ ra sau khi gà mái đẻ này được cấy kháng nguyên bao gồm *Vibrio*

parahaemolyticus, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc chữa hội chứng tôm chết sớm. Chế phẩm này chứa kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ ra sau khi gà mái đẻ này được cấy kháng nguyên bao gồm *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV).

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc chữa hội chứng đốm trắng ở tôm. Chế phẩm này chứa kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ ra sau khi gà mái đẻ này được cấy kháng nguyên bao gồm *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV).

Sáng chế còn đề xuất thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho tôm chứa kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ ra sau khi gà mái đẻ này được cấy kháng nguyên bao gồm *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV).

Thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho tôm có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc chữa hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng ở tôm.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn ngừa các bệnh ở tôm. Phương pháp này bao gồm bước điều trị cho tôm bằng cách sử dụng chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc chữa hội chứng tôm chết sớm, bao gồm kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ ra sau khi gà mái đẻ này được cấy kháng nguyên bao gồm *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV).

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nuôi tôm. Phương pháp này bao gồm bước cho tôm ăn thức ăn hoặc phụ gia thức ăn cho tôm bao gồm kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng do gà mái đẻ ra sau khi gà mái đẻ này được cấy kháng nguyên bao gồm *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV).

Theo sáng chế, kháng thể được tách ra từ lòng đỏ trứng thu được từ gà mái đẻ được tạo

miễn dịch bằng cách cho gà mái đẻ này cấy kháng nguyên đối với hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng, nhờ đó hữu ích làm chế phẩm để ngăn ngừa tôm chết và thức ăn hoặc phụ gia thức ăn.

Ngoài ra, kháng thể theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng (nâng cao) do sự cấu thành của kháng nguyên đối với khuẩn phẩy bacillus và virus gây hội chứng đốm trắng, là sinh vật gây ra hội chứng tôm chết sớm, vì thế biểu hiện độ chuẩn kháng thể cao hơn so với độ chuẩn của kháng thể chỉ đối với bất kỳ một trong khuẩn phẩy bacillus hoặc virus gây hội chứng đốm trắng. Do đó, kháng thể có tác dụng tuyệt vời đến việc ngăn ngừa hoặc chữa hội chứng tôm chết sớm và hội chứng đốm trắng, và được tạo ra nhờ sử dụng gà mái đẻ, vì thế có độ ổn định tuyệt vời và được tạo ra tương đối dễ dàng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các mục đích nêu trên và mục đích khác, các đặc điểm và ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu rõ ràng hơn từ phần mô tả chi tiết sau đây kết hợp với các hình vẽ đi kèm, trong đó:

Fig. 1 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp VP28 của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV) bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch (A: kết quả SDS-PAGE, B: kết quả thẩm tách miễn dịch, làn 1: trước khi cảm ứng IPTG, làn 2: sau khi cảm ứng IPTG, và M: chỉ thị protein);

Fig. 2 là sơ đồ bắt chước của pET-32a(+) OmpW plasmit;

Fig. 3 là sơ đồ bắt chước của pET-32a(+) OmpK plasmit;

Fig. 4 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp OmpW (V1W) của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của *Vibrio parahaemolyticus* bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch (A: kết quả SDS-PAGE, B: kết quả thẩm tách miễn dịch, làn 1: trước khi cảm ứng vector pET-32a (+) ban đầu _BL21 (DE3) sử dụng IPTG, làn 2: sau khi cảm ứng vector pET-32a (+) ban đầu _BL21 (DE3) sử dụng IPTG 1,0mM, làn 3: trước khi cảm ứng OmpW + vector pET-32a(+)_BL21 (DE3) sử dụng IPTG, làn 4: sau khi cảm ứng OmpW + vector pET-32a(+)_OmpW _BL21(DE3) sử dụng IPTG 1,0mM, và M: chỉ thị protein);

Fig. 5 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp OmpK (VbK) của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của *Vibrio harveyi* bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch (A: kết quả SDS-PAGE, B: kết quả thẩm tách miễn dịch, làn 1: trước khi cảm ứng vector pET-32a(+)_BL21 (DE3) sử dụng IPTG 1,0mM, làn 2: sau khi cảm ứng vector pET-32a(+)_OmpW_BL21 (DE3) sử dụng IPTG 1,0mM, và M: chỉ thị protein);

Fig. 6 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng được tạo ra đối với V1 (*Vibrio parahaemolyticus*) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm, trong đó trực hoành chỉ tuần cấy (ví dụ: 1-1 là tuần thứ nhất của lần cấy thứ nhất) và trực tung chỉ độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng;

Fig. 7 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng được tạo ra đối với Vb (*Vibrio harveyi*) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm;

Fig. 8 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng được tạo ra đối với Va (*Vibrio anguillarum*) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm;

Fig. 9 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng được tạo ra đối với WSSV VP28 (protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm;

Fig. 10 hiển thị kết quả SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch của IgY;

Fig. 11 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra ái lực gắn kết đối với kháng nguyên bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch (1: *Vibrio anguillarum*, 2: *Vibrio harveyi*, 3: *Vibrio parahaemolyticus*, 4: WSSV VP28, và M: chỉ thị protein);

Fig. 12 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra tác dụng ức chế sinh trưởng đến V1 (*Vibrio parahaemolyticus*) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm, trong đó trực hoành chỉ thời gian sau cấy và trực tung chỉ giá trị OD;

Fig. 13 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra tác dụng ức chế sinh trưởng đến Vb (*Vibrio harveyi*) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm; và

Fig. 14 hiển thị kết quả thu được bằng cách kiểm tra tác dụng ức chế sinh trưởng đến

Va (*Vibrio anguillarum*) sau khi tiêm vắc xin cho mỗi nhóm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết hơn có tham khảo các ví dụ. Các mục đích, đặc điểm và ưu điểm của sáng chế sẽ được hiểu một cách dễ dàng thông qua các ví dụ sau. Sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ được mô tả trong phần mô tả này, mà có thể được cụ thể hóa ở các dạng khác nhau. Các ví dụ được nêu trong phần mô tả này được đề xuất sao cho các ý tưởng của sáng chế có thể được truyền thụ một cách đầy đủ đến người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan đến sáng chế. Do đó, sáng chế không nên bị hạn chế bởi các ví dụ sau. Ví dụ thử nghiệm 1: Sản xuất kháng thể để ngăn ngừa tôm chết

1-1. Sản xuất kháng nguyên đối với hội chứng chết sớm (EMS)

Để tạo ra kháng nguyên, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471, *Vibrio harveyi* KCTC 12724, và *Vibrio anguillarum* KCTC 2711BP được phân bố và nuôi cấy bằng cách sử dụng dung dịch đậu nành tryptic (TSB) chứa NaCl 3% trong thiết bị ủ lắc ở 120 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C trong 20 giờ. Sau khi dung dịch trong môi trường được nuôi cấy này được đưa vào ly tâm ở 6000 vòng/phút (10 phút, 4°C), các viên được gom và được rửa hai lần bằng PBS để từ đó sản xuất ra 50ml hỗn dịch. Giá trị hấp thụ được điều chỉnh và được cố định đến 0,3 bằng cách sử dụng quang phổ kế ở OD bằng 600nm. 37% formaldehyt, dựa trên tổng thể tích, được bổ sung vào đó và được bất hoạt ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, và chất thu được được sử dụng dưới dạng kháng nguyên để tạo miễn dịch.

1-2. Sản xuất protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng

Để sử dụng VP28, là protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng, dưới dạng kháng nguyên, môi trường LB (dung dịch lysogeny) được sản xuất và được vô trùng, và ampicillin được bổ sung vào đó ở nồng độ bằng 50µg/ml, từ đó tạo ra chế phẩm. Cụm *Escherichia coli* tái tổ hợp biểu hiện protein VP28 (ngân hàng gen: DQ007315.1) của virus gây hội chứng đốm trắng được cấy-phết để từ đó nuôi cấy trên đĩa thạch LB một ngày trước khi cấy được chuẩn bị với lượng là 1% lượng môi trường LB, và sau đó bước cấy được thực hiện. *Escherichia coli* BL21 (DE3) được sử dụng để sản xuất ra protein VP28 tái tổ hợp, là protein

vỏ của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV). Vector biểu hiện được sản xuất bằng cách sử dụng bước thắt vector pET30a (+) có gen khởi đầu T7 và gen VP28, và được sử dụng để biến nạp *Escherichia coli*. *Escherichia coli* được phết lên môi trường đĩa LB (đĩa thạch Luria-Bertani) mà ampicilin (50µg/ml) được bổ sung, vì thế đảm bảo các cụm được biến nạp. 15ml môi trường lỏng LB mà ampicilin được bổ sung được cấy với các cụm này, từ đó tiến hành lắc nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. 15ml dung dịch môi trường nuôi cấy được nuôi cấy cấp hai trong 1,5L môi trường lỏng LB mới mà ampicilin được bổ sung, và mật độ quang (OD) được đo ở bước sóng bằng 600nm bằng cách sử dụng quang phổ kế. Khi mật độ quang (OD) là 0,6, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) được bổ sung ở nồng độ cuối cùng bằng 1,0mM, vì thế gây ra biểu hiện gen.

Sau khi bước nuôi cấy bổ sung được tiến hành trong 6 giờ sau khi bổ sung IPTG, bước ly tâm được tiến hành ở 6.000 vòng/phút trong 30 phút để từ đó thu gom các tế bào. Các tế bào được biểu hiện quá mức bằng IPTG được tái tạo huyền phù trong chất đệm phân giải tế bào (Tris 50mM-HCl (độ pH = 8,0), EDTA 1mM, NaCl 100mM) và được khuấy với 1mg/ml lysozym và 10µg/ml DNaza, được bổ sung vào đó trong thiết bị ủ lắc (200 vòng/phút, 37°C) trong 1 giờ. Sau 1 giờ, các tế bào được đưa vào để nghiền bằng sóng âm sử dụng thiết bị nghiền bằng sóng âm, sau đó là ly tâm (6.000 vòng/phút, 30 phút), từ đó thu gom các viên. Quy trình nêu trên được lặp lại một lần bằng cách sử dụng lysozym. Các viên thu được bằng cách sử dụng lysozym được đưa vào nghiền bằng sóng âm tiếp một lần trong chất đệm ure (Tris-HCl 100mM (độ pH = 8,0), EDTA 5mM, ure 2M, Triton X-100 2%) sử dụng thiết bị nghiền bằng sóng âm, từ đó thu gom protein. Quy trình thẩm tách được tiến hành bằng cách sử dụng PBS (nước muối đệm phosphat) để từ đó loại bỏ ure, và protein đã được thu gom cuối cùng được kiểm tra bằng cách sử dụng SDS-PAGE. Trong SDS-PAGE, gel SDS-PAGE 10% được sử dụng.

Việc liệu protein có được biểu hiện hay không được kiểm tra hơn nữa bằng cách sử dụng thẩm tách miễn dịch. Thẩm tách miễn dịch được tiến hành theo phương pháp đã biết. IgG kháng đầu dò His, được pha loãng ở tỷ lệ bằng 1 : 1000, được sử dụng làm kháng thể thứ nhất trong thử nghiệm này, và HRP kháng IgG ở chuột nhất, được pha loãng ở tỷ lệ bằng 1 : 5000,

được sử dụng làm kháng thể thứ hai.

Từ kết quả thu được bằng cách kiểm tra xem protein có được biểu hiện hay không, sự biểu hiện quá mức của protein ở 12 kda được quan sát. Việc liệu protein có được biểu hiện hay không được kiểm tra đối với 6x-His, được gắn vào đích protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng thẩm tách miễn dịch, và kết quả là, protein được biểu hiện ở kích cỡ protein mong muốn (Fig. 1).

1-3. Sản xuất protein tái tổ hợp của protein màng ngoài của khuẩn phẩy bacillus

OmpW và OmpK, tức là, protein tái tổ hợp của protein epitop, là thể quyết định kháng nguyên của phần protein màng ngoài của *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi*, là các kháng nguyên chính của hội chứng chết sớm, được sản xuất ra bằng cách sử dụng các phương pháp được biết công khai trong YUAN Ye, WANG Xiuli, GUO Sheping, QIU Xuemei *et al.*, *Gene cloning and prokaryotic expression of recombinant outer membrane protein from Vibrio parahaemolyticus*, Chinese Journal of Oceanology and Limnology, Vol. 29, No. 5, P. 952-957, 2011 và trong Li Ningqiu, Bai Junjie, Wu Shuqin, Fu Xiaozhe, Lao Haihua, Ye Xing, Shi Cunbin *et al.*, *An outer membrane protein, OmpK, is an effective vaccine candidate for Vibrio harveyi in Orange-spotted grouper (Epinephelus coioides)*, Fish & Shellfish Immunology, 25, 829-833, 2008.

Để biểu hiện protein tái tổ hợp OmpW và OmpK, dòng vô tính TA được đưa vào để tách dòng được cho phản ứng với enzym giới hạn BamH I và Xho I để từ đó chỉ thu được các gen được xen vào. Sự gắn kết với vector pET32a(+) (#69015-3CN), được sản xuất bởi công ty Novagen, được tiến hành để từ đó thu được dòng vô tính tái tổ hợp (Fig. 2 và 3). Do vector pET32a(+) có gen khởi đầu T7 ở đầu N của nó, protein tương ứng với gen ngoại lai được xen vào có thể được biểu hiện quá mức. Thẻ His, trong đó sáu gốc histidin được lắp lại sau gen khởi đầu T7, có mặt trong đó, và có thể được sử dụng để phát hiện ra protein tái tổ hợp. Dòng vô tính tái tổ hợp đã được sản xuất ra được biến nạp thành tế bào cạnh tranh BL21 (DE3) (#69450-3CN, Novagen) để từ đó thu được một cụm đơn lẻ. 3ml môi trường lỏng LB được cấy bằng cụm đơn lẻ này, sau đó nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ. 50ml môi trường lỏng LB

được cấy thêm bằng dung dịch môi trường nuôi cấy, sau đó nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C. Mức độ hấp thụ (A600) được đo mỗi giờ sử dụng quang phổ kế, và việc nuôi cấy được tiến hành cho đến khi mức độ hấp thụ đạt từ 0,5 đến 0,6. Để sử dụng gen khởi đầu T7 của hệ thống biểu hiện, isopropyl- β -D-thio-galactopyranosit (IPTG; Sigma, USA) được bổ sung đến nồng độ cuối cùng bằng 1mM, sau đó nuôi cấy. Sau đó, 10ml dung dịch môi trường nuôi cấy thu được, và chỉ có các tế bào vi trùng thu được bằng cách sử dụng kỹ thuật ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Các tế bào vi trùng thu được được xử lý bằng 1ml chất đệm phân giải (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM) để từ đó được tái tạo huyền phù. 100 μ g/ml lysozym sau đó được bổ sung để từ đó tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 25°C trong 30 phút. Sau đó, bước phân giải được thực hiện sử dụng thiết bị nghiền bằng sóng âm. Tiếp đó, phần tan và phần không tan được tách sử dụng kỹ thuật ly tâm ở 18.000 vòng/phút trong 30 phút. Việc liệu protein có được biểu hiện trong phần không tan hay không được kiểm tra sử dụng SDS-PAGE (Fig. 4 và 5).

Để khuếch đại gen của OmpW (protein màng ngoài W), là protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của *Vibrio parahaemolyticus*, đoạn môi được tổng hợp có liên quan đến OmpW (chúng zj2003; số gia nhập ngân hàng gen: DQ425109.1) được đăng ký tại ngân hàng gen. Việc so sánh với trình tự của dòng vô tính tái tổ hợp được sản xuất ra bằng cách sử dụng đoạn môi nêu trên được tiến hành, dẫn đến sự đồng nhất 99%. Vì thế, chủng BL21 (DE3) được biến nạp với gen tái tổ hợp pET-32a OmpW được xử lý bằng cách sử dụng IPTG 1,0mM và được nuôi cấy trong 4 giờ, mà thích hợp để sản xuất protein tái tổ hợp OmpW (Fig. 4).

Hơn nữa, để khuếch đại gen của OmpK (protein màng ngoài K), là protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của *Vibrio harveyi*, đoạn môi được sản xuất ra có liên quan đến OmpK (số gia nhập ngân hàng gen: AY332563.1) được đăng ký tại ngân hàng gen. Đoạn môi này được khuếch đại bằng cách sử dụng PCR để từ đó kiểm tra trình tự. Việc so sánh với trình tự theo ngân hàng gen được tiến hành, dẫn đến độ đồng nhất trình tự bằng 98%. Khi chủng BL21 (DE3) được biến nạp bằng cách sử dụng dòng vô tính tái tổ hợp pET-32a OmpK, thì việc xử lý bằng cách sử dụng IPTG 1,0mM được tiến hành, sau đó

nuôi cấy trong 4 giờ. Kết quả là, protein tái tổ hợp OmpK được sản xuất ra một cách hiệu quả (Fig. 5).

1-4. Sản xuất vắc xin để cấy cho gà mái đẻ để sản xuất ra kháng thể noãn hoàng (IgY)

Vật chứa vắc xin, nắp kín bằng cao su, PBS (1×), sàng, nhíp gấp, xi lanh, ống dung tích 50ml, ống pipet dung tích 20μl, chóp dung tích 20μl, và cốc mở làm bằng chất dẻo (500ml, 1000ml) được chuẩn bị để cấy cho gà mái đẻ. Vắc xin trong đó kháng nguyên được sản xuất ra theo ví dụ thử nghiệm 1-1 đến 1-3 được trộn được sản xuất ra như sau.

Dầu 보조 được đặt trong bể nước được làm ấm đến $37 \pm 1^\circ\text{C}$ để được làm ấm trong 15 đến 20 phút. 0,1% của dung dịch formaldehyt 37% được bổ sung vào nước cất vô trùng để từ đó vô trùng thiết bị đồng nhất, nước được loại bỏ khỏi đó, và etanol 70% được phun trên đó để từ đó làm khô thiết bị đồng nhất. Kháng nguyên được sản xuất ra theo ví dụ thử nghiệm 1-1 đến 1-3 ở trạng thái được cấp đông được lấy ra ở nhiệt độ phòng, và các kháng nguyên đã được trộn được sản xuất ra theo cấu tạo được thể hiện trong bảng 1 dưới đây. Etanol 70% được phun trên các kháng nguyên đã được trộn và sau đó các kháng nguyên này được lọc trong trạng thái vô khuẩn bằng cách sử dụng sàng đã gia nhiệt. Khi các kháng nguyên được trộn, PBS vô trùng được bổ sung trong trường hợp khi thể tích cuối cùng của kháng nguyên là không đủ. Các kháng nguyên đã được trộn và dầu 보조 được trộn, và thiết bị đồng nhất được vận hành trong 25 phút để từ đó sản xuất ra vắc xin để cấy cho gà mái đẻ. Trong cấu tạo của kháng nguyên chứa trong vắc xin trong bảng 1, vắc xin chỉ chứa protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng được chỉ định là ví dụ so sánh 1, vắc xin chỉ chứa khuẩn phẩy bacillus, là sinh vật gây ra hội chứng tôm chết sớm, được chỉ định là ví dụ so sánh 2, vắc xin chứa kháng nguyên đã được trộn của khuẩn phẩy bacillus và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng được trộn ở cùng tỷ lệ được chỉ định là Ví dụ 1, và vắc xin chứa kháng nguyên đã được trộn của khuẩn phẩy bacillus và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng và OmpW (V1W) và OmpK (VbK), là protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của khuẩn phẩy bacillus được trộn ở tỷ lệ bằng 1 : 1 : 0,5 : 1 : 0,5 : 0,5 được chỉ định là ví dụ 2.

Bảng 1

Nhóm	Cấu tạo của kháng nguyên chứa trong vắc xin
Ví dụ so sánh 1	WSSV VP28
Ví dụ so sánh 2	V1, Vb, Va, VPE1 (1 : 1 : 1 : 1)
Ví dụ 1	V1, Vb, Va + WSSV VP28 (1 : 1 : 1 : 1)
Ví dụ 2	V1, Vb, Va + WSSV VP28 + V1W + VbK (1 : 1 : 0,5 : 1 : 0,5 : 0,5)

- V1: *Vibrio parahaemolyticus*, Vb: *Vibrio harveyi*, Va: *Vibrio anguillarum*, WSSV: virus gây hội chứng đốm trắng, V1W: protein tái tổ hợp của protein màng ngoài của *Vibrio parahaemolyticus* (OmpW), VbK: protein tái tổ hợp của protein màng ngoài của *Vibrio harveyi* (OmpK)

1-5. Khả năng miễn dịch ở gà mái đẻ

Gà mái đẻ lông nâu Hylin 22 tuần tuổi được cấy 1ml vắc xin được sản xuất ra theo ví dụ thử nghiệm 1-4 trong cơ ngực của nó.

1-6. Gom mẫu lòng đỏ

Đối với các mẫu lòng đỏ, trứng do gà mái đẻ được tạo miễn dịch được thu gom hàng ngày. Những quả trứng đã được thu gom được ghi ngày và lấy mẫu trong khoảng thời gian 7 ngày, và thử nghiệm về độ chuẩn được tiến hành trong mỗi tuần. Để thu được các mẫu để kiểm tra độ chuẩn trong mỗi tuần, năm lòng đỏ được gom ngẫu nhiên trong mỗi tuần và được tách ra, DW (nước đã khử ion) vô trùng ở trọng lượng nhiều hơn 10 lần trọng lượng của lòng đỏ được trộn với nhau, và hỗn hợp thu được được đặt trong ống dung tích 50ml và giữ trong tủ cấp đông trong 24 giờ. Sau 24 giờ, hỗn hợp này được hòa tan trong nước nóng ở nhiệt độ 37°C, dung dịch thu được được đưa vào ly tâm ở nhiệt độ 4°C và 3.500 vòng/phút trong 30 phút, và phần dịch nổi trên bề mặt thu được và được cất giữ làm mẫu để phân tích độ chuẩn.

Ví dụ thử nghiệm 2: Phép đo độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng

2-1. Tách OMP (protein màng ngoài) của kháng nguyên EMS

Sau khi quá trình nuôi cấy khuẩn phẩy bacillus, là kháng nguyên của hội chứng chết sớm (EMS), được hoàn thành, dung dịch môi trường nuôi cấy bacillus được chuyển sang ống ly tâm và được đưa vào ly tâm ở nhiệt độ 4°C và 9.000 vòng/phút trong 30 phút. Phần dịch nổi

trên bề mặt được loại bỏ, ống ly tâm được rửa hai lần bằng PBS, và bacillus được tạo hỗn dịch trong 500ml chất đệm HEPES 10nM (Gibco BRL, USA), sau đó ly tâm và rửa một lần. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ, viên được tạo hỗn dịch trong 300ml chất đệm HEPES 10nM, và bước phân tán được tiến hành với các lượng bằng 30ml mỗi phần, sau đó nghiền bằng sóng âm, đó đó gây ra hiện tượng phân giải kháng nguyên. Phần dịch nổi trên bề mặt được đưa vào ly tâm ở nhiệt độ 4°C và 8.000 vòng/phút trong 30 phút, phần dịch nổi trên bề mặt được tách, và viên được loại bỏ. N-lauroyl sarcosin 1% (SIGMA USA) được bổ sung vào phần dịch nổi trên bề mặt đã được tách và sau đó để yên ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó ly tâm ở nhiệt độ 4°C và 15.000 vòng/phút trong 50 phút. Phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ, viên được tạo lại hỗn dịch trong 50ml chất đệm HEPES 10nM để loại bỏ chất tẩy rửa, và bước ly tâm được tiến hành ở nhiệt độ 4°C và 15.000 vòng/phút trong 50 phút. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên (OMP) được tạo hỗn dịch trong 25ml chất đệm HEPES 10nM. Sau khi các viên được tạo hỗn dịch, các viên này được nghiền bằng sóng âm và được lọc đến kích cỡ bằng 0,45µm, và formalin và thimerosal được bổ sung vào đó. Protein được định lượng, và bước giám sát bằng ELISA được tiến hành bằng cách sử dụng huyết thanh tiêu chuẩn để kiểm tra tính kháng nguyên của kháng nguyên OMP.

2-2. Kiểm tra độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng bằng cách sử dụng ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym)

Độ chuẩn của kháng thể noãn hoàng cụ thể trong số các lòng đỏ trứng được đo bằng cách áp dụng phương pháp ELISA không trực tiếp. Trước tiên, kháng thể noãn hoàng được pha loãng trong chất đệm phủ cacbonat ở nồng độ được xác định từ trước đối với từng kháng nguyên, được áp dụng trên đĩa polystyren có 96 giếng với lượng 100µl mỗi giếng, và được để yên qua đêm ở nhiệt độ 4°C hoặc ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa bằng cách sử dụng PBS-T (nước muối đệm phosphat, Tween 20 0,05%, độ pH = 7,4), bước phong bế được tiến hành bằng cách sử dụng chất đệm PBS chứa BSA 2% (albumin huyết thanh bò) ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ, sau đó rửa theo phương pháp được mô tả trên đây. Nhóm đối chứng âm, nhóm đối chứng dương, và mẫu lòng đỏ đều được pha loãng hai lần, và mỗi nhóm được bổ

sung với lượng 100 μ l vào giếng và để yên ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau 1 giờ, bước rửa được tiến hành ba lần, kháng thể thứ hai (kháng ở gà: Sigma, Mỹ) được pha loãng đến lượng thích hợp trong PBS và được phân tán với lượng bằng 100 μ l vào từng giếng, sau đó phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau khi rửa ba lần, 100 μ l dung dịch TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) được phân tán dưới dạng cơ chất vào từng giếng và được cho phản ứng ở nhiệt độ phòng trong khoảng 10 phút. 100 μ l H₂SO₄ 1,6N làm dung dịch ngừng được phân tán để từ đó ngừng phản ứng, và mức độ hấp thụ của từng giếng được đo bằng cách sử dụng bộ đọc ELISA ở bước sóng bằng 450nm và được biểu hiện dưới dạng giá trị ELISA. Các giá trị đã đo được của lòng đỏ, được xử lý bằng cách nhân đôi giá trị trung bình của các mẫu âm, được thay thế vào các kết quả đã đo được, từ đó thể hiện độ chuẩn của dữ liệu phân tích.

Từ các kết quả thử nghiệm này, như được thể hiện trên Fig. 6 đến Fig. 9, độ chuẩn IgY của ba kiểu khuẩn phẩy bacillus và protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV VP28) được kiểm tra đối với mỗi nhóm. Trong trường hợp ví dụ so sánh 1, độ chuẩn kháng thể không thu được đối với các kháng nguyên khác với kháng nguyên WSSV VP28. Trong trường hợp ví dụ so sánh 2, độ chuẩn tăng từ từ theo tuần đối với mỗi kháng nguyên ngoại trừ kháng nguyên WSSV VP28, và độ chuẩn sau lần cấy thứ ba được tăng lên đến 6.400. Trong trường hợp ví dụ 1, độ chuẩn của kháng nguyên đích tăng một cách ổn định trong mỗi tuần cấy, nhưng sự tăng độ chuẩn không vượt quá cận trên trung bình là 6.400. Trong trường hợp ví dụ 2, độ chuẩn của tất cả các kháng nguyên được làm tăng trong mỗi tuần đến 12.800 hoặc nhiều hơn tính theo trung bình, và khoảng thời gian mà độ chuẩn tăng lên được duy trì lâu hơn so với khoảng thời gian ở các nhóm khác. Kết quả này cho thấy rằng độ chuẩn của kháng nguyên theo ví dụ 2 cao hơn một cách đáng kể so với độ chuẩn của ví dụ so sánh 1 và 2, chỉ bao gồm bất kỳ một trong số kháng nguyên của khuẩn phẩy bacillus và kháng nguyên của protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng.

Ví dụ thử nghiệm 3: Tách kháng thể noãn hoàng theo sự xử lý amoni sulfat

Việc tách và tinh chế được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp amoni sulfat để tách một cách tinh khiết protein kháng thể noãn hoàng cụ thể được sản xuất ra. Trứng có độ

chuẩn cao được gom, lòng trắng trứng và điểm hợp được loại bỏ bằng cách sử dụng thiết bị tách lòng đỏ, màng trứng được loại bỏ bằng cách sử dụng giấy lọc Whatman số 1, và chỉ có lòng đỏ trứng được tách vào cốc nhỏ. Lượng lòng đỏ đã được tách được đo, và nước cất nguyên chất được bổ sung với lượng nhiều gấp 4 lần khối lượng của lòng đỏ. Sau khi khuấy trong 1 giờ, độ pH được điều chỉnh đến 5 bằng cách sử dụng HCl 1M. Dung dịch lòng đỏ này được cất giữ trong tủ đông lạnh cryo ở nhiệt độ -70°C trong một ngày. Dung dịch lòng đỏ được lấy ra ở nhiệt độ phòng và được làm nóng chảy trong khoảng một ngày, và phần dịch nổi trên bề mặt thu được bằng cách ly tâm (9.000 vòng/phút, 4°C) trong 10 phút và được lọc bằng giấy lọc bằng cách sử dụng bơm chân không để từ đó thực hiện việc điều chế. Thể tích của phần dịch nổi trên bề mặt đã được lọc được đo, và amoni sulfat được bổ sung từng chút một trong điều kiện đá lạnh để từ đó hòa tan đủ phần dịch nổi trên bề mặt. Dung dịch được xử lý bằng amoni sulfat được để qua đêm ở nhiệt độ 4°C và sau đó được đưa vào ly tâm trong 30 phút (9.000 vòng/phút, 4°C), từ đó gom các viên. Các viên này được tạo lại hỗn dịch trong $1\times$ chất đệm PBS để từ đó gom mẫu. Thể tích của phần dịch nổi trên bề mặt được đo, và amoni sulfat được bổ sung thêm để từ đó gom các viên và phần dịch nổi trên bề mặt. Độ tinh khiết tách-tinh chế của kháng thể noãn hoàng cụ thể được kiểm tra bằng cách sử dụng SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch. SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch được thực hiện trong các điều kiện giống như trong ví dụ thử nghiệm 1-2.

Trong kết quả thử nghiệm này, phần chuỗi nặng (70 kDa) và chuỗi nhẹ (21 kDa), là các đặc tính của kháng thể IgY, được quan sát kỹ, và protein kháng thể noãn hoàng được xác nhận qua thẩm tách miễn dịch (Fig. 10).

Ví dụ thử nghiệm 4: Kiểm tra ái lực gắn kết với kháng nguyên

Để kiểm tra ái lực gắn kết của kháng thể noãn hoàng đã được sản xuất ra với kháng nguyên, lượng được xác định trước của kháng nguyên được tạo hỗn dịch trong PBS, $5\times$ thuốc nhuộm mẫu được bổ sung, bước điện di được tiến hành, bước chuyển vào màng được tiến hành, bước chặn được tiến hành bằng cách sử dụng sữa không béo 5%, bước rửa bằng PBS-T được tiến hành, kháng thể IgY được xử lý ở nồng độ bằng $2\mu\text{g/ml}$ và sau đó để yên qua đêm ở

nhệt độ 4°C, và bước rửa bằng PBS-T được tiến hành. Bước pha loãng theo tỷ lệ 1 : 20000 được tiến hành bằng cách sử dụng HRP kháng IgG gà, sau đó xử lý. Kết quả này sau đó được kiểm tra bằng cách sử dụng cơ chất HRP (peroxidaza hồi hải mã).

Từ kết quả của thử nghiệm này, được xác nhận rằng kháng thể noãn hoàng được gắn kết với vị trí cụ thể của mỗi kháng nguyên bằng cách sử dụng kháng thể noãn hoàng (Fig. 11).

Ví dụ thử nghiệm 5: Kiểm tra mức độ ức chế sự sinh trưởng của mầm kháng nguyên EMS

Để kiểm tra hiệu quả ức chế sự sinh trưởng khi mầm kháng nguyên EMS được xử lý bằng kháng thể noãn hoàng, mầm kháng nguyên ở nồng độ bằng 1×10^5 cfu/ml được xử lý bằng kháng thể noãn hoàng ở nồng độ bằng 10mg/ml một cách tương tự, và mức độ hấp thụ được đo ở OD bằng 600nm cho đến 0, 3, 6, 9, 12, 24, và 36 giờ, từ đó kiểm tra tác dụng theo chế phẩm kháng nguyên. Trường hợp khi mầm kháng nguyên EMS không được xử lý được chỉ định là nhóm đối chứng để thực hiện thử nghiệm này.

Trong kết quả của thử nghiệm này, trong trường hợp ví dụ so sánh 1, đường cong sinh trưởng là giống như đường cong sinh trưởng của nhóm đối chứng do kháng nguyên đối với EMS không có mặt. Trong trường hợp ví dụ so sánh 2, sự sinh trưởng của mầm kháng nguyên được giảm nhẹ 3 đến 9 giờ sau khi nuôi cấy mầm kháng nguyên, nhưng sau đó, đường cong sinh trưởng dường như có mô hình giống như nhóm đối chứng. Trong trường hợp ví dụ 1, hiệu quả ức chế sự sinh trưởng của mầm kháng nguyên được thể hiện cho đến 3 đến 9 giờ. Trong trường hợp ví dụ 2, các đường cong sinh trưởng giữa 3 và 9 giờ đối với tất cả các mầm kháng nguyên là thấp cùng với giá trị OD thấp so với các giá trị OD của tất cả các nhóm thử nghiệm khác, và giá trị OD cho đến 36 giờ cuối cùng là thấp hơn so với giá trị OD của các nhóm khác. Do đó, như được thể hiện trong thử nghiệm độ chuẩn kháng thể, độ chuẩn kháng thể cao được duy trì, vì thế cải thiện lực gắn kết đối với kháng nguyên (Fig. 12 đến Fig. 14).

Ví dụ thử nghiệm 6: Kiểm tra tác dụng của kháng thể noãn hoàng đến virus gây hội chứng đốm trắng

Để kiểm tra tác dụng của kháng thể noãn hoàng đến virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV), thử nghiệm cấy xâm chiếm được tiến hành. Ấu trùng 40 ngày tuổi của tôm càng trắng

được cho ăn IgY trong 14 ngày trong nước biển được lọc (độ mặn 30‰) trong môi trường ưa khí ở nhiệt độ 25°C. Tôm được cho lây nhiễm WSSV qua đường miệng. Theo thử nghiệm sơ bộ, do mức độ tôm chết đạt 50 đến 70% vào ngày 4, để kiểm soát việc này, một con tôm nhiễm WSSV được cho ăn với lượng khoảng 10% trọng lượng của nó đối với mỗi nhóm. Mức độ chết tích lũy được ghi lại hằng ngày trong 96 giờ, và các kết quả được biểu hiện dưới dạng mức độ chết (%). Hơn nữa, nhóm tôm thử nghiệm không bị lây nhiễm WSSV được chỉ định là nhóm đối chứng bình thường và nhóm tôm thử nghiệm bị lây nhiễm WSSV được chỉ định là nhóm đối chứng dương để tiến hành thử nghiệm này.

Trong kết quả của thử nghiệm này, trong trường hợp ví dụ so sánh 1, là nhóm thử nghiệm chỉ chứa kháng nguyên đối với WSSV, mức độ chết giảm đi khoảng 11% so với nhóm đối chứng dương. Trong trường hợp ví dụ so sánh 2, trong đó không có kháng nguyên đối với WSSV, mức độ chết là 68,75%. Trong trường hợp ví dụ 1 và 2, có cấu tạo kháng nguyên phức tạp, mức độ chết giảm từ khoảng 15 đến 28,75% so với nhóm đối chứng dương. Trong các nhóm kháng nguyên, ví dụ 2 cho thấy mức độ chết bằng 41,25% mà là giá trị thấp nhất trong số tất cả các nhóm thử nghiệm, và được xác nhận rằng tổ hợp của các kháng nguyên trong ví dụ 2 thích hợp nhất để làm vắc xin để ngăn ngừa tôm chết (bảng 2).

Bảng 2

Kiểm tra tác dụng của IgY trên WSSV (cây xâm chiếm)								
Nhóm thử nghiệm	Số lượng thử nghiệm	Liều lượng	Số lượng tôm chết sau 24 giờ	Số lượng tôm chết sau 48 giờ	Số lượng tôm chết sau 72 giờ	Số lượng tôm chết sau 96 giờ	Tổng số lượng tôm chết	Mức độ chết (%)
Nhóm đối chứng bình thường	1	-	0	0	0	1	1	1,25%
	2		0	0	0	0	0	
Nhóm đối chứng dương	1	19 g	3	1	13	14	31	70,00%
	2		0	2	13	10	25	
Ví dụ so	1	19 g	1	0	9	12	22	58,75%

sánh 1	2		1	3	10	11	25	
Ví dụ so sánh 2	1	19 g	2	1	11	14	28	68,75%
	2		1	3	12	11	27	
Ví dụ 1	1	19 g	1	4	5	11	21	55%
	2		1	3	7	12	23	
Ví dụ 2	1	19 g	1	2	8	8	19	41,25%
	2		0	3	5	6	14	

Trong khi sáng chế được thể hiện và được mô tả cụ thể có tham khảo các phương án cụ thể của nó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các phương án cụ thể này chỉ là các phương án được ưu tiên và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở đó. Do đó, phạm vi thực tế của sáng chế sẽ được xác định bằng các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm và các dạng tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất kháng thể lòng đỏ trứng để ngăn ngừa tôm chết, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(a) tạo miễn dịch cho gà mái đẻ bằng cách cho gà mái đẻ này cấy kháng nguyên chứa khuẩn phẩy bacillus (giống *Vibrio*), là tác nhân gây hội chứng tôm chết sớm, protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV), và protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của khuẩn phẩy bacillus với tỷ lệ là 2,5:1:1;

(b) khiến cho gà mái đẻ đã được tạo miễn dịch có thể đẻ trứng; và

(c) tách kháng thể này khỏi lòng đỏ của trứng được đẻ ra,

trong đó trong bước (a), khuẩn phẩy bacillus chứa *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harveyi*, và *Vibrio anguillarum* được trộn với tỷ lệ là 0,7 đến 1,3 : 0,7 đến 1,3 : 0,4 đến 0,7,

trong đó trong bước (a), protein tái tổ hợp của virus gây hội chứng đốm trắng là VP28, và

trong đó protein tái tổ hợp của vị trí quyết định kháng nguyên của protein màng ngoài của khuẩn phẩy bacillus là OmpW (protein màng ngoài W có nguồn gốc từ *Vibrio parahaemolyticus*) và OmpK (protein màng ngoài K có nguồn gốc từ *Vibrio harveyi*).

Fig. 1

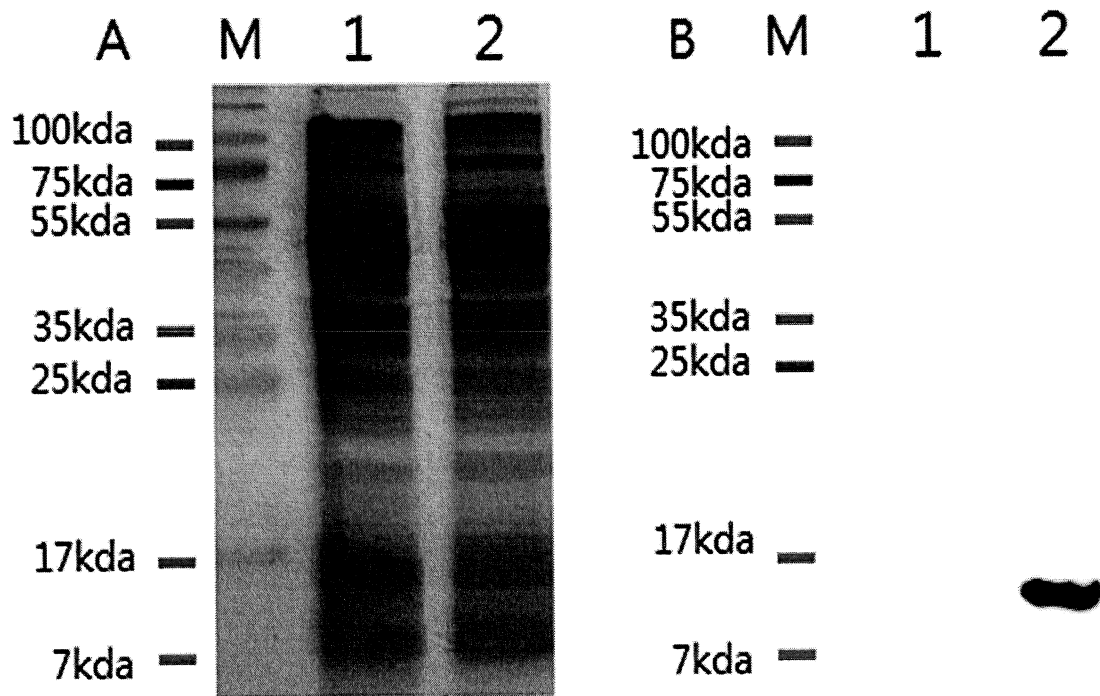


Fig. 2

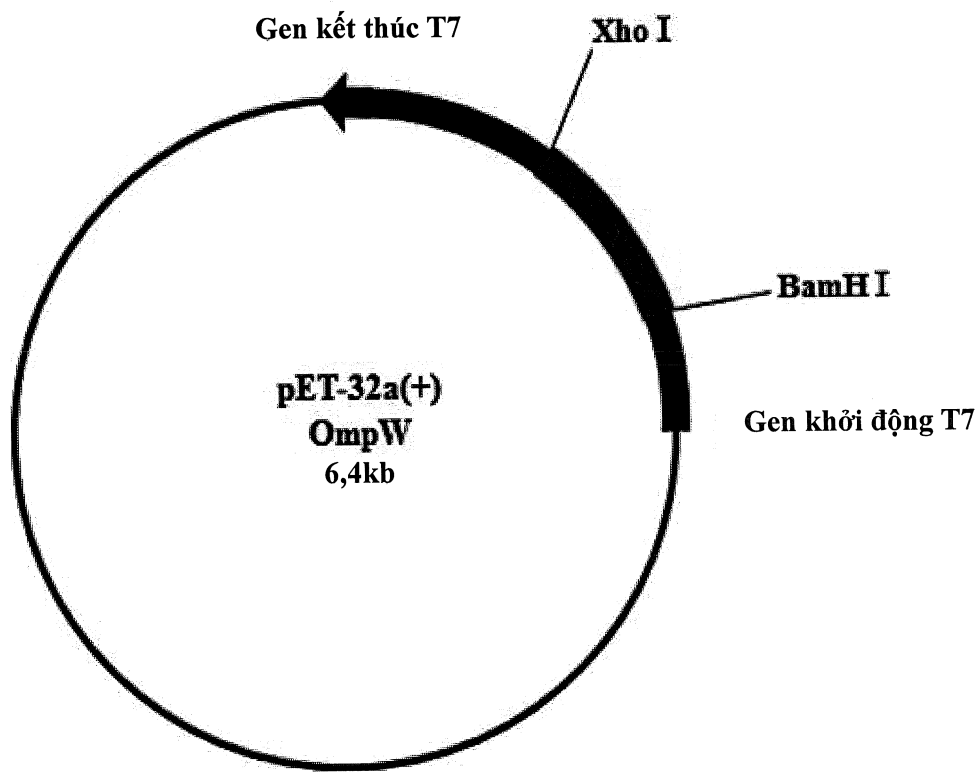


Fig. 3

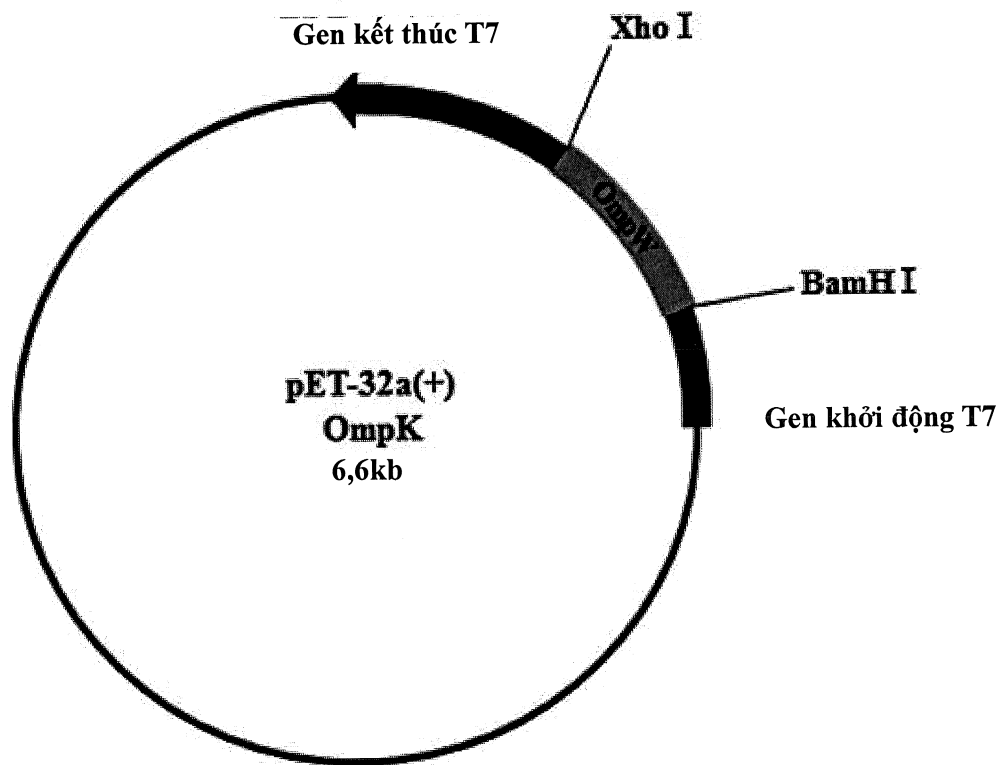


Fig. 4

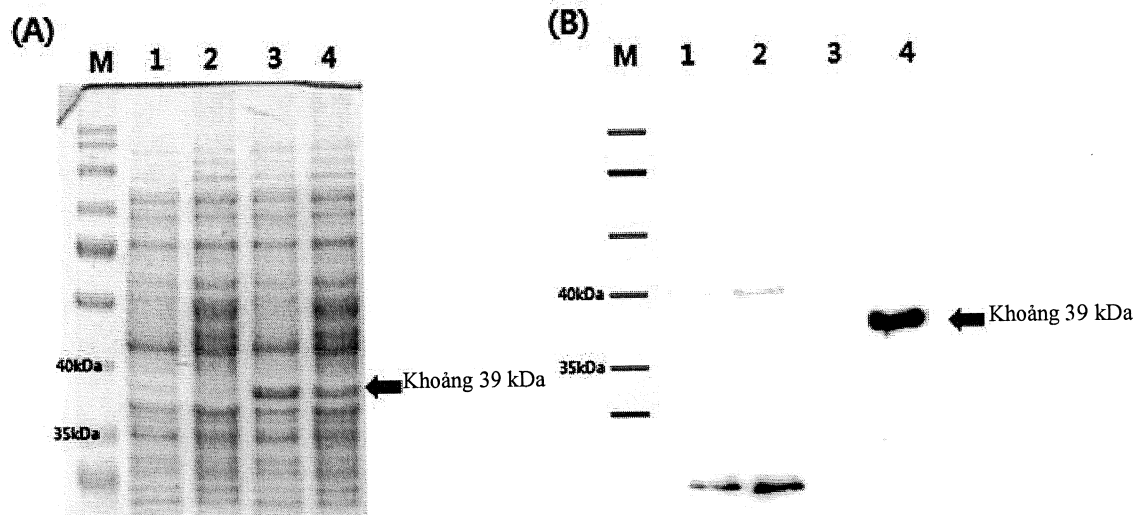


Fig. 5

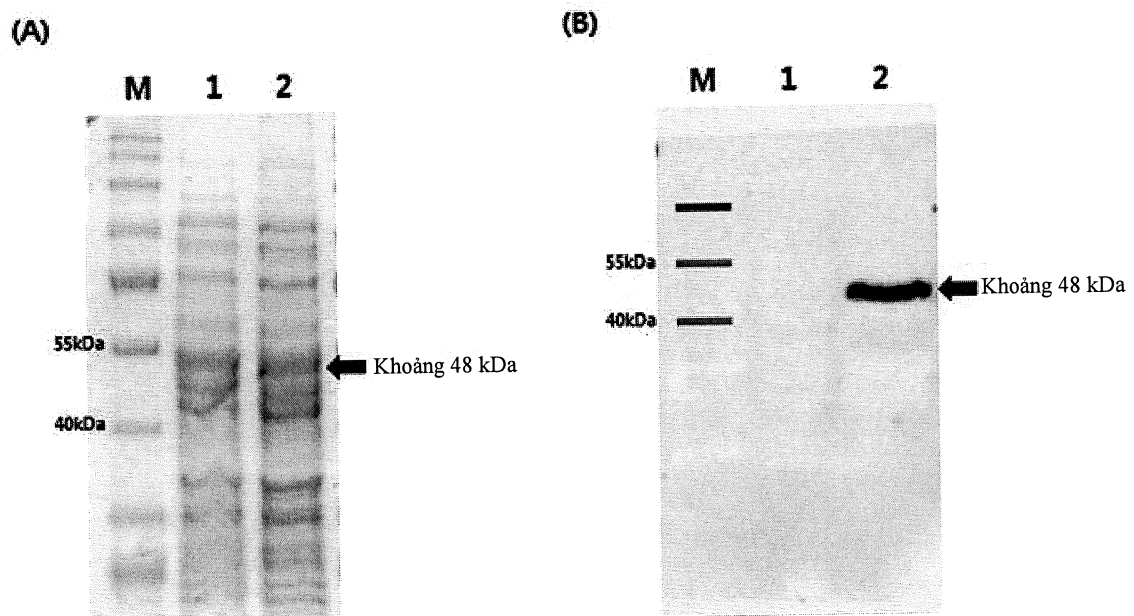


Fig. 6

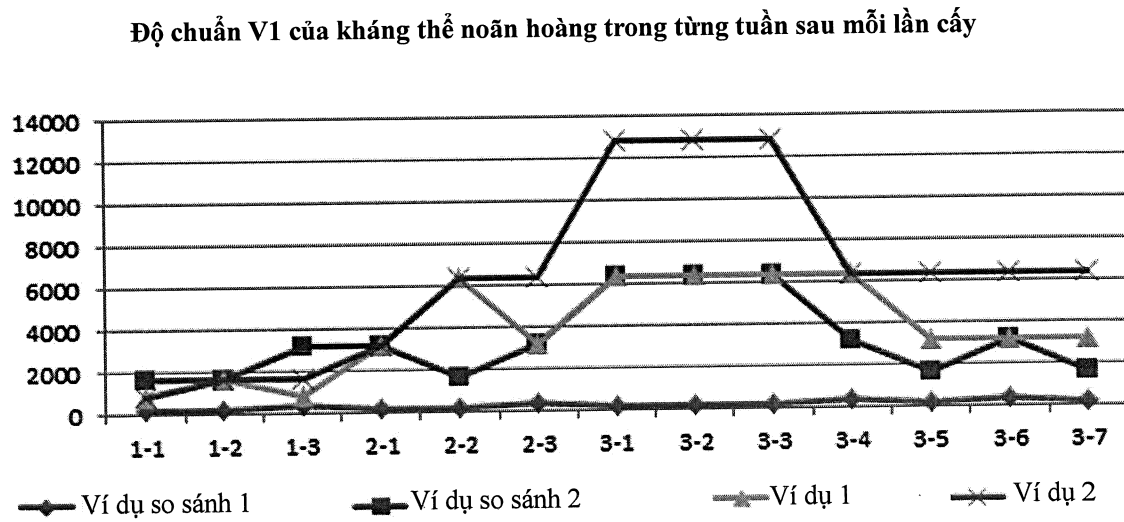


Fig. 7

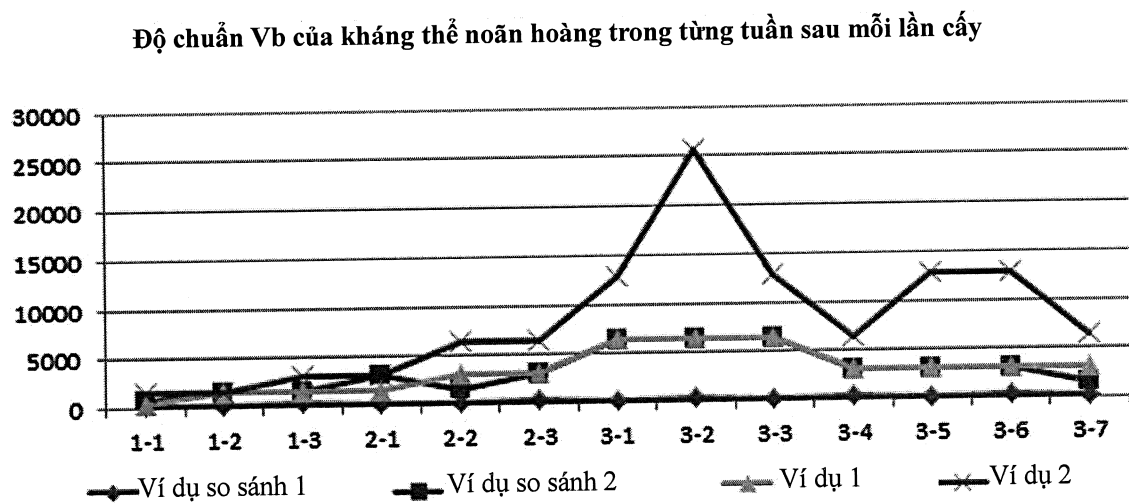


Fig. 8

Độ chuẩn Va của kháng thể hoãn hoàng trong từng tuần sau mỗi lần cấy

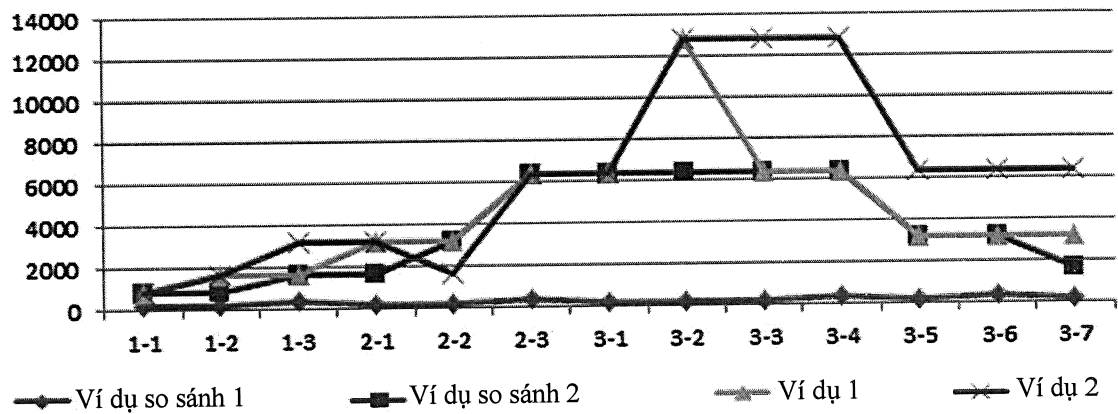


Fig. 9

Độ chuẩn WSSV VP28 của kháng thể hoãn hoàng trong từng tuần sau mỗi lần cấy

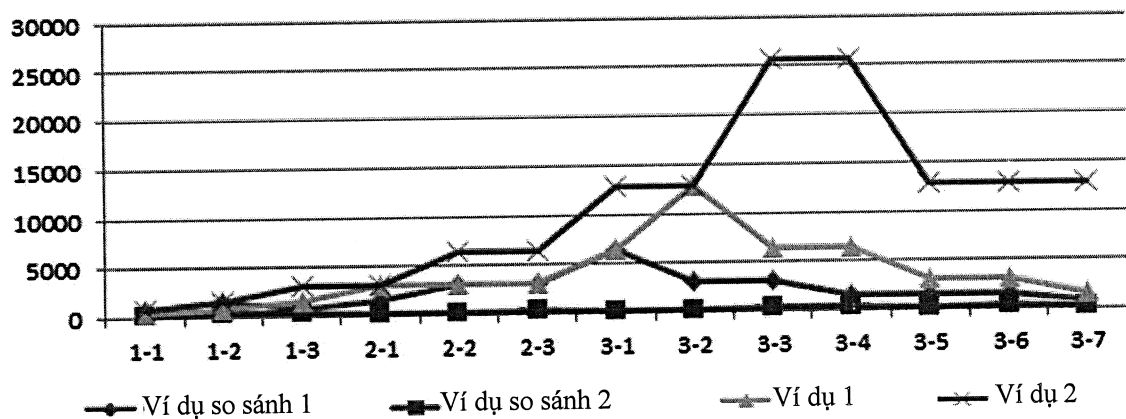


Fig. 10

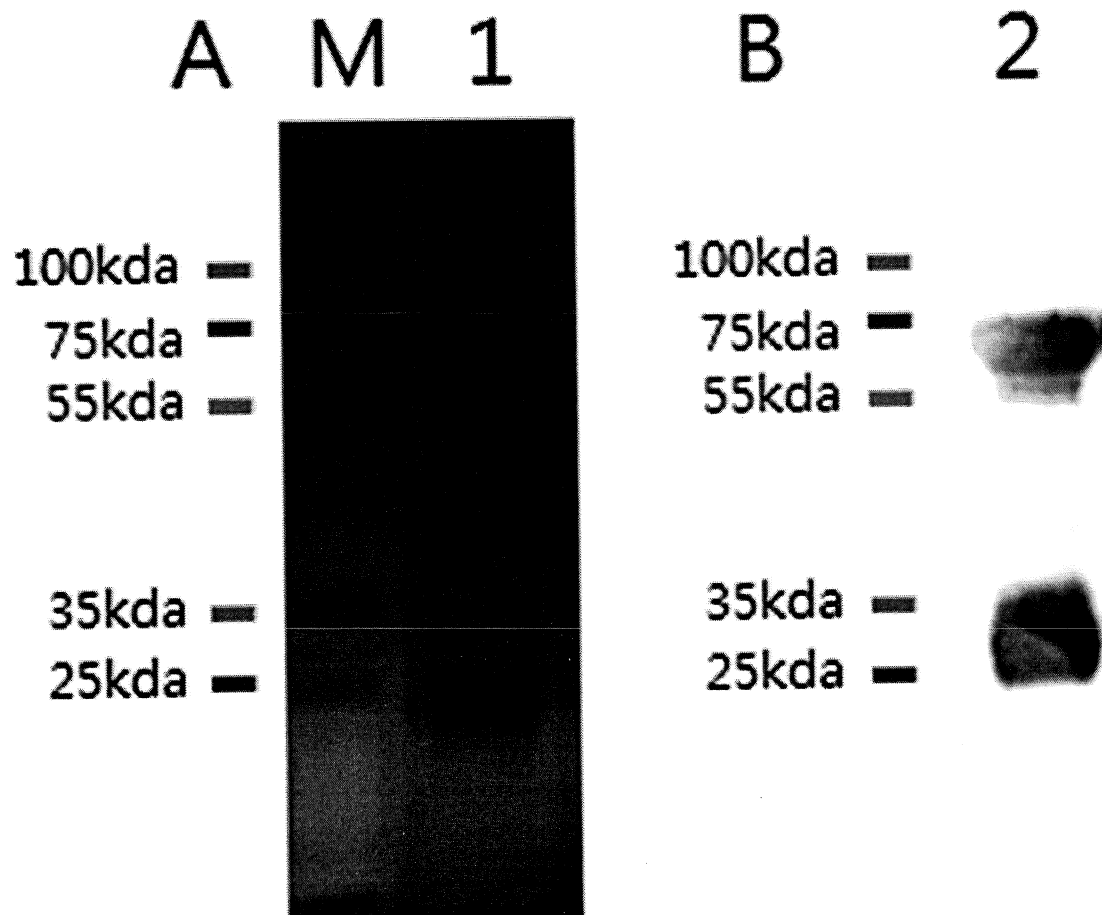


Fig. 11

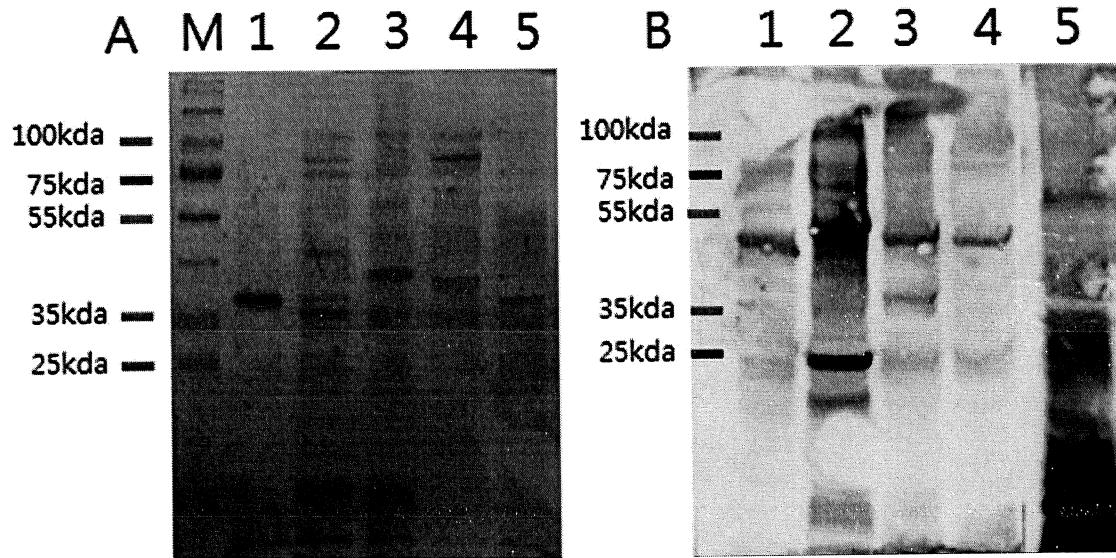


Fig. 12

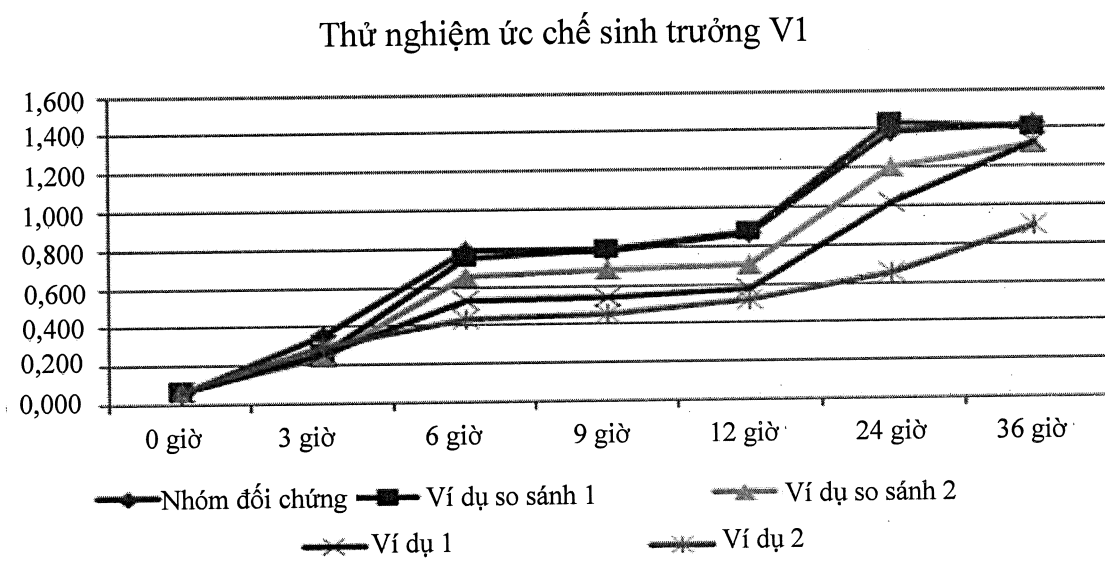


Fig. 13

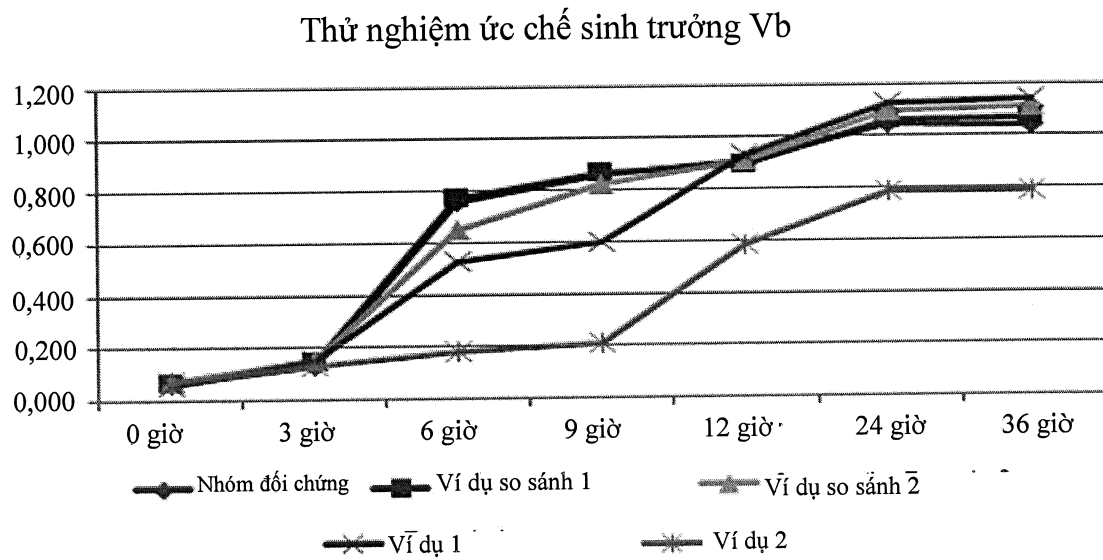


Fig. 14

