



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

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

(11)



1-0041838

(51)⁸ A23K 10/00; A23K 10/12

(13) B

(21) 1-2018-04925

(22) 26/04/2017

(86) PCT/IL2017/050475 26/04/2017

(87) WO 2017/187440 02/11/2017

(30) 62/327,605 26/04/2016 US

(45) 25/11/2024 440

(43) 25/04/2019 373A

(73) VIAQUA THERAPEUTICS LTD. (IL)

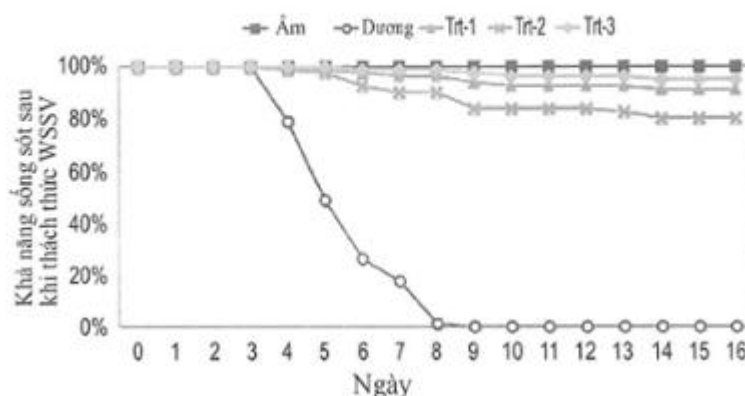
The Trendlines Building, 17 T' chelet (Sky) Street, Misgav Business Park, Doar-Na Misgav, 2017400, Israel

(72) Shai UFAZ (IL); Shai EINBINDER (IL); Adi BALTER (IL); Avraham SCHROEDER (IL); Chen TSROR (IL).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) HẠT NANO CHITOSAN-ARN VÀ DƯỢC THỰC PHẨM CHỨA HẠT NANO NÀY

(57) Sáng chế đề xuất hạt nano bao gồm chitosan được khử axetyl hóa một phần và ss hoặc dsARN bổ sung, liên kết một phần với hoặc ít nhất là 90% tương đồng với đích mARN của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi, chế phẩm và động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh chứa hạt nano này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế cập đến hạt nano bao gồm chitosan được khử axetyl hóa một phần và ss hoặc dsARN bổ sung, liên kết một phần với hoặc ít nhất là 90% tương đồng với đích mARN của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi, chế phẩm và động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh chứa hạt nano này, và phương pháp để sử dụng chế phẩm trong điều trị hoặc phòng ngừa lây nhiễm virus trong nghề nuôi trồng thủy sản.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nuôi trồng thủy sản đã trở thành một trong những ngành phát triển nhanh nhất của sản xuất thực phẩm từ động vật trên thế giới. Sự gia tăng nhanh chóng này được thúc đẩy do giảm trừ lượng thủy sản tự nhiên và gia tăng nhu cầu về hải sản ở Mỹ, Châu Âu và Nhật Bản.

Mặc dù sự phát triển nhanh của của nghề nuôi tôm và việc tiếp tục mở rộng của nó sang các vùng và lãnh thổ khác nhau, sự gia tăng nghề nuôi tôm đã làm tăng các nhân tố áp lực mà làm tăng tính miễn cảm đối với bệnh. Các nhân tố liên quan đến sự lây nhiễm bệnh bao gồm ao quá đông, cho ăn quá mức, thiếu các điều kiện dinh dưỡng và chất lượng nước kém.

Do sản xuất nông nghiệp tiếp tục tăng thị phần so với trữ lượng tự nhiên, nên có tác động của bệnh lên việc nuôi tôm. Các nhà sản xuất đã áp dụng thực hành như mật độ thả giống cao hơn, nuôi ao nội địa nhỏ hơn, và tỉ lệ cho ăn cao hơn để tăng sự cạnh tranh. Điều này dẫn đến làm gia tăng độ nhạy cảm đối với bệnh lây nhiễm, cụ thể là các tác nhân gây bệnh là virus sau đó là lây nhiễm vi khuẩn thứ cấp. Các bệnh virus như virus gây bệnh đốm trắng (WSSV - White Spot Syndrome Virus) đã trở thành dịch bệnh lớn và dẫn đến thiệt hại toàn cầu hàng tỉ đô la. Ví dụ, WSSV được phát hiện đầu tiên vào năm 1992 sau một vài đợt bùng phát bệnh gây tử vong cao xảy ra tại nuôi tôm ở Đài Loan. Người ta đã tính toán rằng chỉ riêng châu Á đã thiệt hại khoảng 6 tỉ đô la Mỹ từ năm 1992, và khu vực châu Mỹ là từ 1-2 tỉ đô la Mỹ do lây nhiễm WSSV năm 1999.

Theo ví dụ khác, Ecuador trải qua thiệt hại rất lớn, 65% thiệt hại trong sản xuất

được tính toán sau khi lây nhiễm WSSV và điều này giải thích, chỉ tính thiệt hại đối với xuất khẩu, hơn một nửa tỉ đô la Mỹ. Ngoài ra, mất 130.000 công việc và hơn 100.000 hecta ao hồ bị bỏ (để tìm hiểu thêm về WSSV, xem, McClennen, Master of Arts Thesis, Tufts University website under “fletcher”). Tương tự, Peru đã trải qua sự giảm sản lượng nhanh chóng xuống 1/10 năm 2000 so với sản lượng năm 1998 với 85% ao hồ nuôi tôm bị vớt bỏ, và thiệt hại 9 tỉ đô la Mỹ chỉ tính riêng mình chi phí nuôi. Ở Trung Quốc, người ta đã ước tính khoảng 80% tổng sản lượng thiệt hại hằng năm do WSSV.

Virut gây bệnh đốm trắng (WSSV) là một trong số các tác nhân gây bệnh lây nhiễm nguy hiểm nhất cho ngành công nghiệp nuôi tôm trong hơn hai thập kỷ qua. Tỷ lệ tử vong tích lũy liên quan đến WSSV thường lên đến 100% trong vòng từ 2 đến 5 ngày kể từ khi bắt đầu có dấu hiệu lâm sàng. Virut có phạm vi vật chủ là động vật chân đốt rộng bao gồm tôm càng xanh, tôm hùm, cua nước ngọt và một số loài cua biển. WSSV thuộc chi Whispovirus (xem tại website NIH NCBI dưới cơ sở dữ liệu ICTV) thuộc họ virut Nimaviridae. Đây là virut dsADN có hình dạng que, có vỏ bọc có chiều dài xấp xỉ là 275nm và chiều rộng là 120nm với các phần phụ dạng đuôi tại một đầu. Giải trình tự của toàn bộ bộ gen WSSV đã chỉ ra rằng nó có 184 khung đọc mở ORF, nhưng vai trò của nhiều protein virut này vẫn chưa được biết đến.

Xấp xỉ khoảng 40 protein cấu trúc đã được xác định trong WSSV, bao gồm 22 protein màng. Bộ gen WSSV chứa 5 protein cấu trúc chính đã được biết đến: VP28, VP19, VP26, VP24 và VP15. Các nghiên cứu về các protein virut WSS đã chỉ ra rằng VP28 và VP19 liên quan đến vỏ bọc virion. VP26 đóng vai trò làm protein vỏ liên kết hai protein liên quan đến nucleocapsit VP24 và VP15 với vỏ bọc.

Gần đây, không có vaccin, liệu pháp điều trị hoặc, sự can thiệp thương mại sẵn có đối với các tác nhân gây bệnh gây ra thiệt hại kinh tế nghiêm trọng đối với các động vật không xương thủy sinh và cụ thể là đối với các quốc gia sản xuất tôm.

Người ta đã phát hiện ra rằng tôm he có cơ chế nội bào cần thiết để gắn kết đáp ứng can thiệp vào ARN đặc hiệu gen (ARNi: gene-specific ARN interference) đáp ứng các (ds)ARN sợi kép, bao gồm ribonucleaza loại Dicer-1 (Su và cộng sự, 2008) và protein tương tự Argonaut (Unajak và cộng sự 2006, Dechklar và cộng sự 2008). Sự tồn tại của cơ chế ARNi gần đây được sử dụng để xác định các chức năng gen ở tôm. Ngoài ra, cơ chế đáp ứng ARNi ở tôm có tiềm năng làm các phương thức can thiệp vào sự sao

chép của virus và các tác nhân gây bệnh khác để bảo vệ tôm chống lại một số bệnh nghiêm trọng có tầm quan trọng kinh tế đối với nghề nuôi trồng thủy sản.

Sự lây nhiễm ở các loài tôm khác nhau với các dsARN hoặc ARN virus nhắm trúng đích dsARN dạng kẹp tóc đã được chỉ ra để can thiệp vào sự sao chép virus và cung cấp ít nhất là sự bảo vệ ngắn hạn chống lại bệnh hoặc tỉ lệ tử vong do virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) (Robalino và cộng sự, 2004, Robalino và cộng sự 2005, Sudhakaran và cộng sự 2011), virus gây hội chứng Taura (TSV: Taura syndrome virus) (Robalino và cộng sự, 2004, Robalino và cộng sự 2005), virus gây bệnh đầu vàng (YHV: yellow head virus) (Yadmuang và cộng sự, 2006) và virus liên quan đến mang (Sellars và cộng sự, 2011).

Ngoài việc làm câm ADN, sự ức chế các gen nội sinh liên quan đến virus như Rab7 tương tác với các protein màng virus, đã được phát hiện để cải thiện sức đề kháng của tôm đối với các bệnh virus (Ongvarrasopone, 2008).

Trong khi bằng chứng thực nghiệm là dsARN có thể bảo vệ tôm chống lại bệnh do virus mang lại nhiều hứa hẹn, hiện tại không có giải pháp nào được phát triển để phân phối hiệu quả dsARN cho trang trại thương mại. Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2015/0159156 của Inberg và cộng sự bộc lộ sự phân phối dsARN nhắm trúng đích kháng Varroa cho các động vật chân đốt (ong mật) bằng cách cung cấp dsARN.

Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2014/0371295 của Loy và cộng sự bộc lộ sự phân phối các sinh vật nhắm trúng đích dsARN có khả năng gây bệnh cho tôm và các động vật không xương thủy sinh (cụ thể là virus Myonecrosis) bằng cách cho ăn, tiêm, cung cấp biolistic, ngâm, tạo bào tử, lipoxom, các hạt replicon alphavirus và các dạng khác của vỏ bao. Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2005/0080032 của Gross và cộng sự bộc lộ sự phân phối các vi sinh vật ký sinh/gây bệnh nhắm trúng đích dsARN của động vật không xương sống ở biển bằng cách tiêm, ăn, ngâm, bao vỏ, đặc biệt là bằng cách phân phối sinh học vi khuẩn của các vi sinh vật được xây dựng về mặt di truyền học biểu hiện dsARN. Các công bố đơn liên quan khác bao gồm US 2013/0245091 và patent Mỹ số 9,011,919 của Rozema và cộng sự, US 2014/0335192 của Ward và cộng sự, US 2011/0033547 của Kjems và cộng sự và công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 2008/003329 của Besenbacher và cộng sự.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh của một số phương án, sáng chế đề xuất hạt nano chitosan-ARN chứa chitosan được khử axetyl hóa một phần và ít nhất một trình tự ARN, trong đó mức độ khử axetyl hóa của chitosan nằm trong khoảng từ 35% đến 59%.

Theo khía cạnh của một số phương án, sáng chế đề xuất được thực phẩm chứa thức ăn cho động vật giáp xác được nuôi và hạt nano chitosan-ARN như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh của một số phương án, sáng chế đề xuất động vật giáp xác được nuôi chứa hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc được thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh của một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp xử lý hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng ở động vật giáp xác được nuôi liên quan đến virus gây bệnh, phương pháp này bao gồm việc cung cấp cho động vật giáp xác được nuôi chế phẩm hạt nano hoặc được thực phẩm như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN là có chiều dài ít nhất là 40 bazơ.

Theo một số phương án của sáng chế, trình tự ARN có khả năng định hướng sự phân cắt của ARN đích thông qua con đường ARNi.

Theo một số phương án của sáng chế, trình tự ARN có thể làm câm sự biểu hiện của gen khi được sử dụng cho cơ thể biểu hiện gen này.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano là hạt nano ổn định, chứa ít nhất 60% ARN trong môi trường chứa nước.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano là hạt nano ổn định, chứa ít nhất 70% ARN trong môi trường chứa nước.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano là hạt nano ổn định, chứa ít nhất 80% ARN trong môi trường chứa nước.

Theo một số phương án của sáng chế, pH của môi trường chứa nước nằm trong khoảng từ 4,2 đến 8,0.

Theo một số phương án của sáng chế, pH của môi trường chứa nước là 7,5.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một oligonucleotit ARN là ARN sợi đơn (ssARN - single stranded RNA).

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một oligonucleotit ARN là ARN sợi kép (dsARN - double-stranded RNA).

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano chitosan được mô tả trong bản mô tả này tăng cường khả năng sống sót của tôm bằng việc cho ăn hạt nano chitosan-ARN.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự có khả năng liên kết thông qua bazơ bổ trợ bắt cặp với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự có khả năng liên kết thông qua bazơ bổ trợ bắt cặp với phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được

mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần với phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN của hạt nano chitosan-ARN, được thực phẩm, động vật giáp xác được nuôi hoặc phương pháp được mô tả trong bản mô tả này chứa ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, mức độ khử axetyl hóa của chitosan được xác định bằng chuẩn độ điện thế.

Theo một số phương án của sáng chế, mức độ khử axetyl hóa của chitosan nằm trong khoảng từ 40% đến 59%, từ 45% đến 55%, từ 43% đến 58%, hoặc 45% đến 50%.

Theo một số phương án của sáng chế, mức độ khử axetyl hóa của chitosan là 55%.

Theo một số phương án của sáng chế, mức độ khử axetyl hóa của chitosan là 35%.

Theo một số phương án của sáng chế động vật giáp xác được nuôi được chọn từ nhóm bao gồm tôm, tôm sú, cua, tôm hùm và tôm hùm đất.

Theo một số phương án của sáng chế, động vật giáp xác được nuôi là tôm và tôm sú.

Theo một số phương án của sáng chế, tôm và tôm sú được chọn từ nhóm bao gồm *Litopenaeus vannamei*, *Panaeus monodon*, *Penaeus japonicas* và *Macrobrachium rosenbergii*.

Theo một số phương án của sáng chế, virus được chọn từ nhóm bao gồm virus gây bệnh đốm trắng (WSSV, số truy cập AF332093), virus gây hội chứng Taura (TSV, số truy cập NC_003005), virus gây bệnh đầu vàng (YHV, số truy cập FJ848673.1), virus liên quan đến mang (GAV, số truy cập NC_010306.1), virus gây bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô (IHHNV, số truy cập NC_002190), virus gây bệnh hoại tử

cơ (IMNV, số truy cập KR815474.1), bệnh đuôi trắng (*Macrobracium rosenbergii* nodavirus, MrNV, số truy cập NC_005094.1 (đoạn 1) và NC_005095.1 (đoạn 2)) và virus gây bệnh hoại tử tụy lây nhiễm (IPNV, số truy cập NC_001915.1 (đoạn A) và NC_001916.1 (đoạn B)).

Theo một số phương án của sáng chế, ARN không có độ tương đồng hoặc đồng nhất đáng kể bất kỳ với trình tự bất kỳ trong số các trình tự gen vật chủ là động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, trình tự bổ trợ một phần hoặc trình tự có khả năng liên kết thông qua bazơ bổ trợ bắt cặp với phân tử axit nucleic đích của ít nhất một trình tự ARN bổ trợ với trình tự của phân tử axit nucleic đích có chiều dài ít nhất 20, ít nhất 40, ít nhất 50, ít nhất 75, ít nhất 100, ít nhất 150, ít nhất 200, ít nhất 250, ít nhất 400, ít nhất 500, ít nhất 600, ít nhất 750 bazơ.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN chứa ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 21 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi tương đồng với ít nhất 30, ít nhất 40, ít nhất 50, ít nhất 75, ít nhất 100, ít nhất 150, ít nhất 200, ít nhất 250, ít nhất 400, ít nhất 500, ít nhất 600, ít nhất 750 bazơ của phân tử mARN đích.

Theo một số phương án của sáng chế, ARN bao gồm trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 5.

Theo một số phương án của sáng chế, ARN bao gồm trình tự axit nucleic tương đồng với ít nhất 21 bazơ liên kề của trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 5.

Theo một số phương án của sáng chế, ARN bao gồm trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59, 64, 77, 78 và 79.

Theo một số phương án của sáng chế, ARN bao gồm trình tự axit nucleic tương đồng với ít nhất 21 bazơ liên kề của trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59, 64, 65, 77, 78 và 79.

Theo một số phương án của sáng chế, phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi là mARN liên quan đến tính miễn cảm và đáp ứng với lây nhiễm của động vật

giáp xác được nuôi đối với virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, phân tử mRNA đích của động vật giáp xác được nuôi bao gồm trình tự mRNA Rab7 hoặc các đoạn của nó.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano chitosan-ARN chứa trình tự ARN được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 47, 53, 54.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano chitosan-ARN chứa ít nhất một trình tự ARN bổ sung có khả năng định hướng sự phân cắt của phân tử mRNA đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN và ít nhất một trình tự ARN bổ sung được định hướng đến mRNA của cùng một virus.

Theo một số phương án của sáng chế, ít nhất một trình tự ARN và ít nhất một trình tự ARN bổ sung được định hướng đến mRNA của các virus khác nhau.

Theo một số phương án của sáng chế, kích thước hạt của hạt nano nằm trong khoảng từ 50 đến 500nm, từ 65 đến 350nm, từ 75 đến 300nm, từ 80 đến 250nm, từ 100 đến 200nm, từ 120 đến 180nm, từ 150 đến 250nm và từ 140 đến 160nm, như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả.

Theo một số phương án của sáng chế, kích thước hạt của hạt nano nằm trong khoảng từ 100 đến 200nm, như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả.

Theo một số phương án của sáng chế, điện tích bề mặt (điện thế z) của hạt nano nằm trong khoảng từ 5 đến 100mV, từ 10 đến 90mV, từ 15 đến 85mV, từ 15 đến 25mV, từ 20 đến 75mV, từ 30 đến 60mV, từ 40 đến 50mV và từ 45 đến 50mV, khi được đo ở pH 4,6.

Theo một số phương án của sáng chế, điện tích bề mặt (điện thế z) của hạt nano nằm trong khoảng từ 150 đến 250mV khi được đo ở pH 4,6.

Theo một số phương án của sáng chế, chitosan được liên hợp với biotin.

Theo một số phương án của sáng chế, chitosan được liên hợp với axit glucuronic.

Theo một số phương án của sáng chế, chitosan được liên hợp với polyme.

Theo một số phương án của sáng chế, polyme được chọn từ nhóm bao gồm poly(lysine) (PLL), polyetylenimin mạch thẳng (l-PEI), polyetylenimin mạch nhánh (b-

PEI), poly(etylen glycol) (PEG), Poly(amido amin) dạng cành G3 (PAMAM), poly(amino amin) mạch thẳng (PAA), poly(lactit-đồng-glycolit) (PLGA) và poly (beta-amino este) (PBAE).

Theo một số phương án của sáng chế, polyme là polyetylen glycol (PEG).

Theo một số phương án của sáng chế, mức độ PEGyl hóa của hạt nano chitosan-ARN nằm trong khoảng từ 1 đến 60%, từ 5 đến 50%, từ 10 đến 40%, từ 15 đến 35%, từ 5 đến 40% và từ 20 đến 30%.

Theo một số phương án của sáng chế, tỉ lệ polyme-chitosan/ARN đối với chitosan-ARN là nằm trong khoảng từ 2:1 đến 15:1, từ 4:1 đến 12:1, từ 5:1 đến 10:1 và từ 6:1 đến 8:1 đối với chitosan.

Theo một số phương án của sáng chế, tỉ lệ polyme-chitosan/ARN đối với chitosan-ARN là 8:1 đối với chitosan được khử axetyl hóa cao và 50:1 đối với chitosan được khử axetyl hóa 55%.

Theo một số phương án của sáng chế, việc ăn hạt nano hoặc được thực phẩm bởi động vật giáp xác được nuôi dẫn đến làm giảm mức độ virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi, so với cùng động vật giáp xác được nuôi ăn thức ăn không chứa ARN được nhắm trúng đích sản phẩm gen của virus gây bệnh.

Theo một số phương án của sáng chế, việc ăn hạt nano hoặc được thực phẩm bởi động vật giáp xác được nuôi dẫn đến khả năng sống sót, năng suất, tốc độ tăng trưởng, sức sống, sinh khối, chuyển đổi thức ăn, kích thước, chất lượng hương vị hoặc mùi vị hoặc khả năng chịu đựng áp lực của động vật giáp xác được nuôi tăng lên, so với cùng động vật giáp xác được nuôi ăn thức ăn không có ARN nhắm trúng đích sản phẩm gen của virus gây bệnh.

Theo một số phương án của sáng chế, động vật giáp xác được nuôi là tôm, và chế phẩm hạt nano hoặc được thực phẩm được cung cấp với tần suất từ 1 đến 3 lần ăn trên mỗi chu kỳ sống.

Theo một số phương án của sáng chế, động vật giáp xác được nuôi là tôm, và số lần cho ăn ít nhất là hai lần cho ăn mỗi ngày trong khoảng thời gian ít nhất là 5 ngày.

Theo một số phương án của sáng chế, động vật giáp xác được nuôi là tôm, và trong đó được thực phẩm được cung cấp với liều lượng nằm trong khoảng từ 3 đến 10%

khối lượng cơ thể tôm mỗi lần cho ăn mỗi ngày.

Trừ khi được chỉ ra theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và/hoặc khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng một nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực của sáng chế. Mặc dù phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trên thực tế hoặc thử nghiệm theo các phương án của sáng chế, nhưng các phương pháp và/hoặc nguyên liệu ví dụ sẽ được mô tả dưới đây. Trong trường hợp mâu thuẫn, bản mô tả sáng chế, bao gồm các định nghĩa sẽ điều chỉnh. Ngoài ra, các nguyên liệu, phương pháp, và ví dụ là chỉ làm minh họa và không nhằm giới hạn sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Một số phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, bằng cách là ví dụ minh họa, với tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo. Bây giờ, tham chiếu cụ thể đến các hình vẽ chi tiết, cần phải lưu ý rằng các phần cụ thể được thể hiện bằng cách ví dụ và chỉ với mục đích minh họa cho các phương án của sáng chế. Về vấn đề này, phần mô tả với các hình vẽ kèm theo làm cho sáng chế trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này về cách mà các phương án theo sáng chế được thực hiện.

Các hình vẽ bao gồm:

FIG.1 là hình minh họa các thay đổi hóa học xảy ra trong phản ứng N-axetyl hóa của chitosan;

FIG.2 là biểu đồ minh họa mức độ axetyl hóa của chitosan (được biểu hiện dưới dạng mức độ khử axetyl hóa giảm) là hàm số của nồng độ anhydrit axetic. Lưu ý hàm số về cơ bản tuyến tính trong suốt toàn bộ khoảng nồng độ của anhydrit axetic;

Các hình vẽ từ FIG.3A đến FIG.3C là các ảnh chụp gel agarosa minh họa ảnh hưởng của mức độ khử axetyl hóa lên hiệu quả liên kết dsARN chitosan đối với chitosan không được xử lý (FIG.3A), dẫn xuất chitosan H42 (FIG.3B, mức khử axetyl hóa 41,6%) và dẫn xuất chitosan H35 (FIG.3C, mức khử axetyl hóa 35,1%). Trong tất cả các gel, đường 1 là chỉ thị ADN, đường 2 là đối chứng dsARN tự do và các đường 3-14 là các chế phẩm hạt nano có các tỉ lệ khối lượng polyme/Rab7 là 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20,

25, 30, 35 và 40. Lưu ý rằng dẫn xuất chitosan có mức độ khử axetyl hóa cao hơn (FIG.3A) liên kết với dsARN dễ dàng hơn các dẫn xuất có mức độ khử axetyl hóa thấp hơn (FIG.3B và FIG.3C);

Các hình vẽ FIG.4A-FIG.4B là các biểu đồ minh họa các thay đổi về các tính chất vật lý ảnh hưởng đến các tương tác tế bào (kích thước hạt - FIG.4A và điện tích bề mặt [điện thế zeta] - FIG.4B) của các hạt nano, được vẽ đồ thị dưới dạng hàm số tỉ lệ khối lượng polyme/Rab7 của các hạt nano chitosan-dsARN. FIG.4A thể hiện tác động của tỉ lệ khối lượng của các hạt nano H42/Rab7 được gia tăng lên kích thước hạt nano (tương quan dương). FIG.4B thể hiện tác động của sự axetyl hóa lên điện tích bề mặt (điện thế zeta) của các hạt nano chitosan. Lưu ý rằng tỉ lệ khối lượng tăng lên dẫn đến tăng kích thước hạt nano (FIG.4A), trong khi các hạt nano được điều chế từ chitosan đã được N-axetyl hóa một phần (H42 và H55) khác biệt rõ ràng ở chỗ các giá trị điện thế zeta (FIG.4B) thấp hơn các giá trị của chitosan không được xử lý;

FIG.5 là biểu đồ minh họa sự làm câm gen hiệu quả ở tôm bởi việc cung cấp hạt nano chitosan-dsARN theo đường sử dụng thức ăn. Tôm được cho ăn với chế phẩm chế độ ăn chứa hỗn hợp Rab7 (ARN tự do), H35/Rab7 (tỉ lệ khối lượng 50), H42/Rab7 (tỉ lệ khối lượng 40), H55/Rab7 (tỉ lệ khối lượng 30) và Cs/Rab7 (tỉ lệ khối lượng 8) hoặc cho ăn bình thường hai lần mỗi ngày trong 5 ngày (cung cấp theo đường ăn thức ăn 1,5µg Rab7 mỗi con tôm mỗi lần cho ăn mỗi ngày), và 48 giờ sau lần cho ăn cuối cùng, tất cả các con tôm bị giết chết và chiết xuất ARN tổng số để phân tích RT-PCR. Lưu ý rằng việc làm câm in-vivo hiệu quả bằng hạt nano chứa các dẫn xuất chitosan được N-axetyl hóa một phần (H42 và H35) và dsARN;

Các hình vẽ từ FIG.6A đến FIG.6C là các biểu đồ minh họa tác động liên hợp PEG lên hiệu quả liên kết dsARN (FIG.6A) và các tính chất vật lý (FIG.6B và FIG.6C) của chitosan. Phân tích gel (FIG.6A) chỉ ra rằng liên kết của các hạt chitosan với PEGyl hóa bị giảm đi, còn thể hiện bởi các giá trị điện tích bề mặt (zeta) giảm (FIG.6C) và kích thước hạt lớn hơn (FIG.6B);

FIG.7A và FIG.7B là các biểu đồ minh họa tác động của liên hợp PEG lên các tính chất vật lý (kích thước) của dẫn xuất chitosan H55. Lưu ý rằng sự giảm về đường kính hạt trung bình của dẫn xuất chitosan H55 được PEGyl hóa (FIG.7A) và tác động rõ rệt của sự nghiền bằng sóng âm lên kích thước hạt dẫn xuất chitosan H55 được PEGyl

hóa (FIG.7B);

FIG.8 là biểu đồ minh họa sự làm câm gen hiệu quả ở tôm bằng cách cung cấp theo đường ăn thức ăn các hạt nano dsARN dẫn xuất chitosan và chitosan được PEGyl hóa. Tôm được cho ăn với các chế phẩm chế độ ăn chứa Rab7 tự do (ARN tự do), các hạt nano dsARN chitosan và chitosan được PEGyl hóa (80/20) (PEG-Cs/Cs), H55 và H-55 được PEGyl hóa (50/50) và H55/H55 được PEGyl hóa (90/10) có 0,02 mol của phức hợp protamin hoặc cho ăn bình thường hai lần mỗi ngày trong 5 ngày (cung cấp theo đường ăn thức ăn 1,5 μ g Rab7 mỗi con tôm mỗi lần cung cấp mỗi ngày).

48 giờ sau lần cho ăn cuối cùng tất cả các con tôm bị giết chết và chiết xuất ARN tổng số để phân tích RT-PCR. Lưu ý rằng việc làm câm in-vivo hiệu quả bằng các hạt nano chứa dẫn xuất chitosan được N-axetyl hóa một phần PEGyl hóa (H55) và dsARN;

Các hình vẽ từ FIG.9A đến FIG.9D là các hình minh họa gel thể hiện tác động của mức độ khử axetyl hóa lên tính ổn định của hạt nano chitosan-dsARN trong môi trường chứa nước, thông qua khoảng giá trị pH (FIG.9A là pH 4,6, FIG.9B là pH 7,0 và FIG.9C là pH 8,0) và thời gian ủ (FIG.9D là dẫn xuất chitosan H55-dsARN ở pH 7, từ 0 đến 240 phút), dsRab7 ARN (250bp), được tạo phức hợp với các dẫn xuất chitosan H55(DD=55%, NP1), H42(DD=42%, NP2) hoặc H35(DD=35%, NP3) được bộc lộ đối với việc tăng pH bằng NaOH 1M, và được làm mẫu cho phân tích giải phóng dsARN bằng điện di gel. M=100bp chỉ thị ADN, “ARN tự do” = ARN dsRab7 không tạo phức hợp. Lưu ý rằng tính ổn định tuyệt đối của các hạt nano trên cơ sở H55, và tính ổn định một phần của các hạt nano trên cơ sở H42 và H32;

FIG.10 là hình minh họa gel thể hiện độ kháng của dsARN phức hợp-chitosan với sự thủy phân RNaza. ARN dsRab7 (250bp), được tạo phức hợp với các dẫn xuất chitosan H55(DD=55%, NP1) hoặc H42(DD=42%, NP2) được ủ trong 1 giờ với RNaza A [(II)RNaza] (sự thủy phân của “ARN tự do” là hoàn toàn trong 30 phút), sự phân hủy được dừng lại bằng cách bổ sung chất ức chế RNaza, sau khi giải phóng ARN bằng chitosanaza [(II)RNaza + giải phóng]. M=100bp chỉ thị ADN, “ARN tự do” = ARN dsRab7 không được tạo phức hợp. Lưu ý rằng độ kháng hoàn toàn với sự thủy phân RNaza của các hạt nano trên cơ sở H55 (NP1), và độ kháng một phần của các hạt nano trên cơ sở H42 (NP2);

FIG.11 là biểu đồ cột thể hiện kích thước hạt nano bị giảm của các hạt nano Rab7

sợi đơn (250bp) - chitosan (cột màu đen) so với hạt nano Rab7 sợi kép (250bp) - chitosan (cột màu xám), trên khoảng tỉ lệ khối lượng chitosan:ARN. Kích thước được thể hiện dưới dạng đường kính thủy động trung bình z từ phân tích tích lũy của hàm tương quan sử dụng độ nhớt và chỉ số khúc xạ của nước;

FIG.12 là biểu đồ cột thể hiện kích thước hạt nano của các hạt nano-chitosan được tạo phức hợp với ARN dsRab7 70, 125 và 250bp (tỉ lệ chitosan:ARN = 8). Kích thước được biểu hiện dưới dạng đường kính thủy động trung bình z từ phân tích tích lũy của hàm tương quan sử dụng độ nhớt và chỉ số khúc xạ của nước;

FIG.13 là hình minh họa gel thể hiện độ kháng của dsARN phức hợp-chitosan với sự thủy phân RNaza. ARN (ss)Rab7 sợi đơn (250b), được tạo phức hợp với chitosan chưa được xử lý (DD=83%, tỉ lệ khối lượng chitosan : ARN = 8) được ủ trong 1 giờ với RNaza A [(II)RNaza] (sự thủy phân của “ARN tự do” hoàn toàn trong 30 phút), sự phân hủy được dừng lại bằng cách bổ sung chất ức chế RNaza, sau đó giải phóng ARN bằng chitosanaza. M =100bp chỉ thị ADN, “ARN tự do” = ARN dsRab7 không được tạo phức hợp. Lưu ý rằng độ kháng hoàn toàn với sự thủy phân RNaza của các hạt nano chitosan-ssRab7;

FIG.14 là biểu đồ minh họa sự làm câm gen in-vivo hiệu quả ở tôm bằng cách tiêm ARN Rab7 sợi đơn hoặc sợi kép. Cá thể tôm *Peneaus vanameii* được tiêm bằng 5 μ l (0,5 μ g/g) ssRab7 (250b) hoặc dsRab7 (250bp) có nghĩa hoặc đối nghĩa tự do không được tạo phức hợp, 1% NaCl (đối chứng) hoặc hỗn hợp ssRab7 (250b) có nghĩa và đối nghĩa (50%/50%). Biểu hiện Rab7 tương đối được thử nghiệm ở mang trong 24 giờ sau khi tiêm tổng hợp cADN từ ARN mô mang được chiết xuất và qPCR sử dụng mỗi đặc hiệu Rab7. Định lượng là tương đối đối với đối chứng không được xử lý đặt là “1”. Lưu ý rằng việc làm câm gen hiệu quả với tất cả các chế phẩm ARN ds hoặc ssRab7 được tiêm;

FIG.15 là biểu đồ minh họa sự làm câm gen in-vivo hiệu quả ở tôm bằng việc tiêm các hạt nano được tạo phức hợp của chitosan ARN Rab7 sợi đơn hoặc sợi kép. Cá thể tôm *Peneaus vanameii* được tiêm 5 μ l (0,5 μ g/g) dsRab7 (250bp) hoặc ssRab7 (250b) có nghĩa hoặc đối nghĩa tự do không tạo phức hợp, dsRab7 (250bp) hoặc ssRab7 (250b) có nghĩa hoặc đối nghĩa được tạo phức hợp với chitosan, 1% NaCl (đối chứng) hoặc ARN ssRab7 có nghĩa được tạo phức hợp với chitosan được xử lý RNaza A. Biểu hiện

Rab7 tương đối được thử nghiệm ở mang trong 24 giờ sau khi tiêm tổng hợp cADN từ ARN mô mang được chiết xuất và qPCR sử dụng mỗi đặc hiệu Rab7. Định lượng là tương đối đối với đối chứng không được xử lý đặt là “1”. Lưu ý rằng sự làm câm gen hiệu quả cao với cả ARN Rab7 có nghĩa cũng như đối nghĩa sợi đơn được tạo phức hợp và tự do và hoạt tính câm gen kháng RNaza của phức hợp hạt nano ARN ssRab7 có nghĩa - chitosan;

FIG.16 là biểu đồ minh họa sự gia tăng tỉ lệ sống sót ở tôm sử dụng chitosan-dsARN sau khi lây nhiễm virus gây bệnh đốm trắng. Năm nhóm (20 con tôm mỗi nhóm, 4 bản sao mỗi điều trị) của tôm nguyên sinh (2g) nhận các lần tiêm: Điều trị 1 (tam giác) = đoạn ARN VP28 250bp (tự do) không được tạo phức hợp, SEQ ID NO: 59; điều trị 2 (“X”) = đoạn ARN VP28 125bp (tự do) không được tạo phức hợp, SEQ ID NO: 64; điều trị 3 (hình kim cương) = đoạn ARN VP28 250bp - glu-chitosan, SEQ ID NO: 59; điều trị 4 (vòng tròn chấm) = hỗn hợp của 3 trình tự ARN chứa 4 gen: VP28, VP19 [VP19+VP28- (SEQ ID NO: 77)], rr2 (SEQ ID NO: 78) và wsv477 (SEQ ID NO: 79). Đối chứng dương (vòng tròn mở) = 2% NaCl + WSSV và đối chứng âm (hình vuông) = 2% NaCl. Virus WSSV (lây nhiễm vào cơ thịt của tôm, xấp xỉ 10^7 hạt WSSV mỗi gam, liều lượng = 5% khối lượng cơ thể) được cung cấp cho các nhóm điều trị 1-4 và nhóm đối chứng dương bằng cách tiêm ở 48 giờ và tiêm lặp lại ở 65 giờ sau xử lý. Đối chứng âm giữ không bị lây nhiễm.

Sau khi tiêm (các ngày sau khi tiêm, dpi), đếm số tôm trong mỗi nhóm hai lần mỗi ngày và ghi lại khả năng sống sót qua 18 ngày. Lưu ý rằng sự khởi phát nhanh và mức độ nghiêm trọng của bệnh ở các đối chứng dương được xử lý salin (vòng tròn mở), tỉ lệ sống sót của nhóm tiếp nhận ARN virus bằng việc tiêm tăng lên, và tỉ lệ sống sót cao với việc sử dụng hạt phức hợp ARN WSSV-glu-chitosan-ds (điều trị 3) hoặc hỗn hợp của các ARN virus (điều trị 4);

FIG.17 là hình minh họa gel thể hiện tương quan giữa tỉ lệ sống sót và độ kháng với lây nhiễm WSSV ở tôm được điều trị bằng chitosan-dsARN. Năm nhóm tôm bị lây nhiễm, như được mô tả trong FIG.16 (T1-T5: Phương pháp điều trị 1-5, Pos: đối chứng dương) và một nhóm giữ các trình tự WSSV (Neg: đối chứng âm) không lây nhiễm và không được xử lý được phát hiện trong các mẫu mô từ các nhóm khác nhau bởi phát hiện PCR được đặt vào tại 4, 7 và 14 ngày sau khi lây nhiễm (dpi). T = nhóm điều trị (T1, T2, T3). EF-1 – gen đối chiếu cho đối chứng PCR. Thang kích thước M = 100bp. Mẫu 4 và 14

ngày được gộp ARN từ 4 cá thể trong mỗi nhóm, trong khi các mẫu ngày 7 được thử nghiệm riêng lẻ (tất cả T11, T12, T21, T22 và T23 là các mẫu từ tôm chết). “N” và “P” đề cập đến đối chứng PCR bên trong dương tính và âm tính. Lưu ý sự vắng mặt của các trình tự WSSV có thể phát hiện ở tôm được điều trị khỏe mạnh làm mẫu, mặc dù tiếp xúc với virus.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế, theo một số phương án, đề cập đến phương pháp tạo hạt nano liên kết với ARN - ssARN và dsARN và, cụ thể hơn là, nhưng không loại trừ, đề cập đến việc sử dụng của các hạt nano liên kết với ARN - ssARN và dsARN này để tăng sức đề kháng của động vật giáp xác sống ở nước được nuôi với virus. Cụ thể, sáng chế đề xuất các hạt ARN-chitin được biến đổi và phương pháp tăng cường sức đề kháng đối với lây nhiễm tác nhân gây bệnh là virus lên động vật giáp xác sống ở nước được nuôi, như tôm và tôm sú.

Các nguyên lý và thao tác theo sáng chế có thể được hiểu rõ hơn với tham chiếu đến các hình vẽ kèm theo.

Trước khi giải thích cụ thể ít nhất một phương án của sáng chế, cần phải hiểu rằng sáng chế không chỉ giới hạn ở phần bộc cụ thể và ví dụ minh họa được đưa ra trong bản mô tả này. Sáng chế có thể bao gồm các phương án khác hoặc được thực hành hoặc thực hiện theo nhiều cách khác nhau. Ngoài ra, cần phải hiểu rằng thuật ngữ và cách diễn đạt được sử dụng trong bản mô tả này chỉ với mục đích miêu tả và không nên xem là làm giới hạn sáng chế.

Ứng dụng của kỹ thuật cảm gen đối với việc nuôi thương phẩm đã tạo ra mối được đề cập lớn, cung cấp các phương thức có thể bù lại các thiệt hại do biến động gen mà thường xảy ra đối với các loài tự nhiên, nhưng làm giảm đáng kể quá trình thuần hóa và giao phối cận huyết của các loài thương phẩm. Tuy nhiên, sự phát triển các phương thức để phân phối hiệu quả và có hiệu quả về chi phí lượng chất cảm ARN hiệu quả đối với cơ thể vật chủ đã được chứng minh là khó nắm bắt.

Nghề nuôi trồng thủy sản, hoặc nuôi trang trại hoặc nuôi trồng các loài thủy sinh, là ngành công nghiệp lâu đời nhưng vẫn đang phát triển nhanh, đặc biệt quan trọng trong thời gian gần đây do suy giảm nhiều trữ lượng nước mặn và nước ngọt tự nhiên, và sự gia tăng sử dụng cá hoặc hải sản trong chế độ ăn của người phương Tây. Các loài thủy

sinh thông thường được nuôi bấy giờ bao gồm cá, động vật giáp xác, động vật thân mềm và thậm chí là tảo biển và động vật da gai (hải sâm).

Cùng với các ưu điểm nuôi trang trại, nuôi quần thể thủy sinh mật độ cao, và biến đổi gen bị hạn chế của quần thể được nuôi đã tạo ra cơ hội cho các tác nhân gây bệnh và đặc biệt là tác nhân gây bệnh là virus, phát triển và đôi khi đạt đến tỉ lệ dịch bộc phát, dẫn đến thiệt hại về thu nhập và giảm đáng kể quần thể trữ lượng.

Trong khi việc làm câm gen bởi ARNi có thể là giải pháp hấp dẫn đối với các thách thức đang cần các phương thức điều trị trong môi trường nuôi cấy (ví dụ, dsARN có thể được khuếch đại trong cá thể vật chủ), các phương pháp để phân phối hiệu quả và hiệu quả về chi phí của tác nhân ARNi đối với loài thủy sinh được nuôi chưa được phát triển. Các nghiên cứu câm gen in vivo với các hạt nano chitosan làm nền cung cấp đã đáp ứng được một ít thành công.

Trong khi để đưa sáng chế vào thực tiễn, các tác giả đã phát triển chế phẩm nền chitin có thể liên kết và phân phối hiệu quả dạng ARNi. Các tác giả đã xác định được, thông qua thử nghiệm khắt khe, các biến đổi đặc hiệu của khung chitosan có thể được sử dụng để tạo ra các hạt nano chitosan-ARN chứa ARN sợi kép (dsARN) và/hoặc ARN sợi đơn (ssARN) mà, khi được ăn hoặc cung cấp cho tôm, phân phối hiệu quả ARN đến tế bào của cơ thể vật chủ (làm câm sự biểu hiện gen được nhắm trúng đích ARN) (xem ví dụ I, FIG.5, ví dụ II, FIG.8), do đó cung cấp phương thức hiệu quả để làm câm gen virus. Cụ thể, các tác giả đã phát hiện ra rằng việc giảm mức độ khử axetyl hóa của chitosan đến khoảng cụ thể làm gia tăng đáng kể liên kết đảo ngược của ds và ssARN và sự hình thành của các hạt nano chitosan-ARN ổn định trong môi trường và phạm vi của pH sinh lý và có hiệu quả trong việc phân phối ARN đến cơ thể vật chủ, và do đó ảnh hưởng đến biểu hiện gen virus, thông qua việc ăn và thông qua việc cung cấp trực tiếp (ví dụ, tiêm). Ngoài ra, các tác giả đã thành công trong việc giảm biểu hiện gen virus và tăng cường khả năng sống sót của tôm tiếp xúc với WSSV bằng cách sử dụng các hạt nano chitosan-ARN để tạo câm virus gây bệnh đốm trắng nhắm trúng đích ARN (WSSV).

Hơn nữa, việc bổ sung polyme vào hạt nano được có hiệu quả hơn trong việc cung cấp (các) trình tự can thiệp ARN ở tôm ăn các hạt nano bị biến đổi (xem ví dụ II và các hình vẽ từ FIG.6A đến FIG.6C, FIG.7A và FIG.7B và FIG.8).

Do vậy, theo một số phương án của một khía cạnh, sáng chế đề xuất hạt nano chitosan-ARN (chitosan-ARN) chứa chitosan được khử axetyl hóa một phần và ít nhất một ARN, trong đó mức độ khử axetyl hóa của chitosan nằm trong khoảng từ 35% đến 59%.

Thuật ngữ “chitin”, như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến polyme sinh học mạch dài của N-axetylglucosamin [tức là, 2-(axetyl-amino)-2-deoxy-D-glucosơ] trong liên kết beta-1,4 [poly(N-axetyl-1,4-beta-D-glucopyranosamin)]. Chitin có ở khắp nơi trong xương ngoài của côn trùng và thành tế bào nấm và vi khuẩn, và có sẵn rất nhiều trên thị trường (xem, ví dụ, sản phẩm Sigma-Aldrich số C7170, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Sự khác biệt giữa chitin alpha, beta và gamma là khác nhau trong cách sắp xếp của mạch polyme của chúng (và, sau đó, trong các đặc tính cơ học của chúng): chitin alpha có sự sắp xếp đối song xen kẽ của các mạch (phổ biến nhất ở động vật giáp xác); chitin beta có sự sắp xếp song song của các mạch polysacrit (phổ biến ở mực) và chitin gamma có hai mạch song song xen kẽ về mặt thống kê với mạch đối song (phổ biến ở tảo). Thuật ngữ “chitin” đồng nghĩa với một trong số chitin alpha, beta hoặc gamma bất kỳ, trừ khi được chỉ ra khác đi. Chitin có thể là chitin tự nhiên, từ các cơ thể chứa chitin tự nhiên, chitin tái tổ hợp từ các cơ thể được xây dựng về mặt di truyền học sản sinh chitin hoặc chitin tổng hợp được tổng hợp về mặt hóa học từ quá trình polyme hóa của hỗn hợp glucosamin monome hoặc oligome. Các loại khác nhau của sự sắp xếp polyme chitin có thể phân biệt được, ví dụ, bằng quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (^1H NMR) và phép trắc khối phổ thời gian bay ion hóa giải hấp laser hỗ trợ nền (MALDI-TOF MS).

Chitin không tan hoàn toàn, chỉ tan trong hệ dung môi mạnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chitosan” đề cập đến polyme chitin khử axetyl hóa mà, ngược lại với chitin, có các nhóm amino tự do. Chitosan có thể thu được bằng quá trình khử axetyl hóa kiềm của chitin, tạo ra polyme chitin có các nhóm amin được axetyl hóa ngẫu nhiên, với các tính chất khác nhau phụ thuộc vào mức độ khử axetyl hóa và chiều dài mạch. Chitosan là an toàn, không độc, dễ dàng hòa tan trong các dung dịch axit yếu và có thể tương tác với nhiều anion tạo ra phức hợp và gel. Chitosan có thể, ngoài những đặc điểm khác, khác biệt ở tỉ lệ của các nhóm amin được axetyl hóa và amin không được axetyl hóa (khử axetyl hóa) trong polyme, và ở kích thước mạch trung bình của polyme. Chitosan thương mại thường được bán là dạng bột

ở định hướng alpha, beta hoặc gamma (theo nguồn chitin), với mức độ khử axetyl hóa (%DD) nằm trong khoảng từ 60 đến 100%, và trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 4 đến 20kDa, và có mức độ tinh sạch khác nhau. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chitosan khử axetyl hóa một phần” đề cập đến chitosan đã được xử lý thành axetat một phần của nhóm amin tự do được khử axetyl hóa. Như trong chitosan thương mại, chitosan được khử axetyl hóa một phần khác biệt bởi mức độ khử axetyl hóa (%DD). Quá trình khử axetyl hóa (hoặc “tái axetyl hóa”) của các nhóm amin được khử axetyl hóa của chitosan có thể được thực hiện theo nhiều phản ứng khác nhau, hầu hết dựa trên phản ứng của nhóm amin tự do của chitosan với anhydrit axetic (Ac_2O), như được mô tả trong FIG.1. Theo một phương án, chitosan được axetyl hóa bằng cách hòa tan chitosan (ví dụ, 80% chitosan được khử axetyl hóa có trọng lượng phân tử (MW) từ 40-150kDa) trong 4% anhydrit axetic của axit axetic trong etanol, dừng phản ứng bằng trung hòa, và chitosan được tạo kết tủa, rửa và tinh sạch. Sử dụng phương pháp này, việc giảm mức độ khử axetyl hóa của chitosan phụ thuộc vào tỉ lệ chitosan hỗ trợ với số mol của anhydrit axetic (xem FIG.2).

Mức độ khử axetyl hóa của chitosan có thể được xác định bởi các phương pháp khác nhau, được phân loại thành ba loại: (1) phương pháp quang phổ (IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{15}N NMR, và UV); (2) phương pháp thông thường (các dạng khác là chuẩn độ, phép đo điện thế, thử nghiệm ninhydrin, hấp thụ các nhóm amino tự do của chitosan bằng axit pictric) và (3) phương pháp phá hủy (phân tích nguyên tố, thủy phân chitin/chitosan bằng axit hoặc enzym và sau đó đo DA bằng phép đo màu hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký khí nhiệt phân, và phân tích nhiệt sử dụng phép đo lượng nhiệt quét vi sai). Theo một số phương án của sáng chế, mức độ khử axetyl hóa của chitosan được xác định bằng cách sử dụng chuẩn độ đo điện thế, ví dụ, trong đó mẫu chitosan được hòa tan trong HCl (ví dụ, HCl 0,1M), được hòa tan bằng cách khuấy và gia nhiệt, và được chuẩn độ (sử dụng dụng cụ đo pH) với dung dịch NaOH 0,1. Lượng axit sử dụng giữa hai điểm uốn của đường cong chuẩn độ tương ứng với số lượng nhóm amin tự do (mức độ khử axetyl hóa).

Theo một số phương án, mức độ khử axetyl hóa được tính toán từ chuẩn độ đo điện thế sử dụng công thức dưới đây:

$$\%DD = 2,03 \left[\frac{V2 - V1}{m + 0,0042(V2 - V1)} \right]$$

trong đó m là trọng lượng của mẫu. V_1 , V_2 là thể tích của dung dịch natri hydroxit 0,1M tương ứng với các điểm lệch. 2,03 là hệ số do trọng lượng phân tử của đơn vị chitin monome. 0,0042 là hệ số do sự chênh lệch giữa trọng lượng phân tử của chitin và đơn vị chitosan monome.

Theo một số phương án, lượng amin tự do trong chitosan, và cụ thể chitosan được khử axetyl hóa cao (ví dụ chitosan thương mại có DD lớn hơn 80%) có thể được thay đổi bằng cách liên hợp với các phân tử khác nhóm axyl, hoặc bằng các phân tử này ngoài việc khóa các nhóm amin với các nhóm axetyl. Sự liên hợp chitosan với các phân tử khác nhóm axetyl, tương tự sự axetyl hóa chitosan, dẫn đến chitosan biến đổi có ít nhóm amin tự do hơn, do đó có thể tương đương với chitosan có mức độ khử axetyl hóa thấp hơn chitosan được khử axetyl hóa cao trước khi liên hợp. Theo các phương án cụ thể, các hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế bao gồm chitosan liên hợp với biotin. Theo các phương án khác, các hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế bao gồm chitosan liên hợp với axit glucuronic. Theo một số phương án, các hạt nano chitosan-ARN bao gồm chitosan liên hợp với biotin hoặc axit glucuronic, chitosan tương đương với chitosan có mức độ khử axetyl hóa nằm trong khoảng từ 35 đến 59%.

Tóm lại, sự liên hợp của chitosan với axit glucuronic (ví dụ, axit D-glucuronic) có thể được thực hiện với sự có mặt của N-(3-dimethylaminopropyl-) N'-ethylcarbodiimide hydroclorua và N-hydroxysuccinimide, bằng việc khuấy mạnh ở nhiệt độ phòng. Sự liên hợp của chitosan với biotin có thể được thực hiện với sự có mặt của N, N'-dimethylformamide, N-(3-dimethylaminopropyl-) N'-ethylcarbodiimide hydroclorua và N-hydroxysuccinimide, bằng việc khuấy mạnh ở nhiệt độ phòng. Các thể liên hợp thu được có thể còn được tinh sạch bằng thẩm tách rộng và được đông khô để lưu trữ.

Trong khi để đưa sáng chế vào thực tiễn, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng trong khi chitosan được khử axetyl hóa cao có thể liên kết với dsARN và tạo ra các hạt nano chitosan-dsARN hiệu quả hơn chitosan được khử axetyl hóa một phần nằm trong khoảng độ khử axetyl hóa từ 35% đến 66% (ví dụ I, các kết quả và các hình vẽ từ FIG.3A đến FIG.3C), các hạt nano chitosan-dsARN bao gồm chitosan ít được khử axetyl hóa cao (sự khử axetyl hóa nằm trong khoảng từ 35% đến 66%) hiệu quả hơn trong việc làm câm gen của gen được nhắm trúng đích bởi trình tự dsARN in vivo. Các nghiên cứu thêm chỉ ra rằng mức độ khử axetyl hóa thậm chí thấp hơn có thể có hiệu quả, và các mức độ khử axetyl hóa thấp hơn không làm giảm đáng kể hiệu quả của hạt nano làm ổn

định trọng lượng vận chuyển ARN dưới các điều kiện sinh lý học (ví dụ, môi trường chứa nước, pH sinh lý và tiếp xúc RNaza). Do đó, theo một số phương án, mức độ khử axetyl hóa của chitosan được khử axetyl hóa một phần, được xác định bằng chuẩn độ đo điện thế, nằm trong khoảng từ 35% đến 59%. Theo một số phương án, mức độ khử axetyl hóa của chitosan được khử axetyl hóa một phần, như được xác định bằng chuẩn độ đo điện thế, nằm trong khoảng từ 40% đến 59%, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 45% đến 55%, theo một số phương án nằm trong khoảng từ 43% đến 58% và theo một số phương án nằm trong khoảng từ 45% đến 50%. Theo một số phương án, mức độ khử axetyl hóa của chitosan được khử axetyl hóa một phần là 59%, hoặc nằm trong khoảng từ 58% đến 60%, theo một số phương án là 55%, hoặc nằm trong khoảng từ 54% đến 55%, theo một số phương án là 42%, hoặc nằm trong khoảng từ 41% đến 42% và theo một số phương án là 35%, hoặc nằm trong khoảng từ 35% đến 36%. Cần phải hiểu rằng mỗi khoảng thể hiện mỗi phương án khác nhau theo sáng chế. Theo các phương án khác, mức độ khử axetyl hóa của chitosan được khử axetyl hóa một phần là 55%, theo một số phương án là 42%, và theo các phương án khác là 35% như được đo bằng phép đo hiệu điện thế.

Theo một số phương án của sáng chế, hạt nano chitosan-ARN bao gồm ít nhất một ARN sợi kép (dsARN). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dsARN” đề cập đến hai sợi của các axit polyribonucleic đối song song giữ cùng nhau bằng cách bắt cặp bazơ. “dsARN” có thể còn được mô tả dưới dạng “phần kép dsARN” hoặc “phần kép ARN” hoặc “ARN kép”. Hai sợi có thể có cùng chiều dài hoặc chiều dài khác nhau được đề xuất có đủ độ tương đồng trình tự giữa hai sợi mà cấu trúc sợi kép được tạo ra với mức bổ sung ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% trên toàn bộ chiều dài. Mức độ bổ trợ giữa các dải của dsARN thích hợp để sử dụng với sáng chế như được mô tả trong bản mô tả này trong bản mô tả này được chọn tạo ra ít nhất là sự bổ sung đủ để gây tác động câm gen của phân tử ARN đích được đề cập.

Theo các phương án cụ thể khác, hạt nano chitosan-ARN bao gồm ít nhất một ARN sợi đơn (ssARN). Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ssARN” đề cập đến sợi đơn của axit polyribonucleic. Khi ARN sợi đơn là ARN câm được định hướng đến trình tự đích đặc hiệu trong cơ thể đích (ví dụ, trình tự của tôm như Rab7, hoặc trình tự tác nhân gây bệnh như WSSV, VP28, VP19 hoặc Rr2, v.v.), ssARN có thể hoặc tương đồng với trình tự ARN đích hoặc một phần của nó (“sARN có nghĩa”), hoặc,

theo cách khác, bổ trợ với trình tự ARN đích hoặc một phần của nó (“ssARN đối nghĩa”). Theo một số phương án, các hạt nano có thể bao gồm tổ hợp của ssARN có nghĩa và đối nghĩa.

Cần phải lưu ý rằng một số trình tự ARN sợi đơn có thể bao gồm các phần tự bổ sung (ví dụ, “xuôi ngược” hoặc “trình tự phụ”) mà, trong các điều kiện nhất định, có thể tạo ra các đoạn bắt cặp bazơ bên trong, dẫn đến sự tạo ra ARN sợi kép một phần từ ARN sợi đơn của hạt nano theo sáng chế. Cần phải lưu ý rằng ss hoặc dsARN có thể được xác định xét về trình tự axit nucleic của ADN mã hóa bản sao gen đích, và cần phải hiểu rằng trình tự ss hoặc dsARN đối nghĩa tương ứng với trình tự mã hóa của gen chứa phần bổ sung ARN của trình tự mã hóa của gen, hoặc trình tự khác của gen mà được phiên mã thành ARN.

Ss hoặc dsARN có thể được sử dụng để giảm điều hòa biểu hiện gen bằng cách làm câm ARN. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm câm ARN” đề cập đến nhóm cơ chế điều hòa [ví dụ, can thiệp ARN (ARNi), làm câm gen phiên mã (TGS), làm câm gen sau phiên mã (PTGS), dập tắt, đồng khử triệt, và kiểm chế dịch mã] được qua trung gian bởi phân tử ARN mà dẫn đến ức chế hoặc “làm câm” biểu hiện của gen mã hóa protein tương ứng, hoặc trong một số trường hợp, gen mã hóa sản phẩm ARN chức năng. Việc làm câm ARN đã được quan sát ở nhiều loại sinh vật khác nhau, bao gồm thực vật, động vật (động vật có xương và động vật không xương) và nấm.

ARN có thể là ss hoặc dsARN mà có khả năng ức chế đặc hiệu hoặc “làm câm” biểu hiện của gen đích. Theo một số phương án, ARN có khả năng ngăn chặn xử lý hoàn toàn (ví dụ, toàn bộ quá trình dịch mã và/hoặc biểu hiện) của phân tử mRNA thông qua cơ chế làm câm sau phiên mã. Khi được sử dụng để làm câm gen, ARN bao gồm các phân tử ARN không mã hóa, ví dụ, phân kép ARN chứa sợi bắt cặp, cũng như ARN tiền chất mà ARN không mã hóa nhỏ có thể được tạo ra từ đó. ARN ví dụ có thể được sử dụng để làm câm ARN bao gồm phân kép siARN, miARN và shARN. Theo một phương án, ARN có khả năng gây ra sự can thiệp ARN. Theo phương án khác, ARN có khả năng làm trung gian kiểm chế dịch mã. Theo phương án khác nữa, ARN có khả năng định hướng sự phân cắt ARN đích. Sự phân cắt của ARN đích này có thể bị tác động thông qua con đường ARNi, như được mô tả chi tiết dưới đây.

Trình tự ARN ức chế của ARN có thể tương đồng hơn 90%, hoặc thậm chí là

tương đồng 100% với phần của bản sao gen đích. Theo một số phương án, ARN, ví dụ, vùng kép của dsARN có thể được xác định chức năng dưới dạng trình tự nucleotit mà có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với phân tử mARN của virus, ví dụ, lai hóa với một phần của bản sao gen đích trong các điều kiện nghiêm ngặt (ví dụ, NaCl 400mM, PIPES 40mM pH 6,4, EDTA 1mM, quá trình lai hóa ở 60°C trong khoảng thời gian từ 12-16 giờ; sau đó rửa).

Theo một số phương án, trình tự ARN ức chế của hạt nano là trình tự ARN có nghĩa, sợi đơn, bao gồm ít nhất một trình tự có sự tương đồng ít nhất là 90% với bản sao gen đích (ví dụ, phân tử mARN đích).

Chiều dài của trình tự nucleotit sợi kép hoặc sợi đơn bổ sung hoặc tương đồng với bản sao gen đích có thể ít nhất là khoảng 18, 19, 20, 21, 25, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 491, 500, 600 hoặc ít nhất là 750 bazơ hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, các trình tự nucleotit sợi kép hoặc sợi đơn bổ sung hoặc tương đồng với bản sao gen đích bao gồm ít nhất là 20, ít nhất là khoảng 21, 25, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 491, 500, 600 hoặc ít nhất là 750 bazơ liên tiếp hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, chiều dài của trình tự mARN đích có thể có chiều dài ít nhất là 20, ít nhất là 40, ít nhất là 50, ít nhất là 75, ít nhất là 100, ít nhất là 150, ít nhất là 200, ít nhất là 250, ít nhất là 400, ít nhất là 500, ít nhất là 600, ít nhất là 750 bazơ. Cần phải hiểu rằng mỗi chiều dài thể hiện một phương án riêng.

Theo một số phương án của một số khía cạnh của sáng chế, chiều dài của trình tự nucleotit sợi đơn hoặc sợi kép nằm trong khoảng từ 40 đến 440, khoảng từ 50 đến 450, khoảng từ 60 đến 350, khoảng từ 60 đến 300, và khoảng từ 80 đến khoảng 250 nucleotit đối với các gen của virus của động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh của nó. Theo một số phương án của một số khía cạnh của sáng chế, chiều dài của trình tự nucleotit sợi đơn hoặc sợi kép nằm trong khoảng từ 50 đến 350 nucleotit đối với gen của virus của động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh của nó. Theo các phương án cụ thể, chiều dài của trình tự nucleotit sợi đơn hoặc sợi kép là 125 hoặc 250. Cần phải hiểu rằng mỗi khoảng riêng biệt thể hiện một phương án riêng rẽ và khác nhau.

Thuật ngữ “tương đương với” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là trình tự polynucleotit có độ tương đồng (hoặc độ đồng nhất, ví dụ, độ tương đồng 100%) với tất cả hoặc một phần của trình tự polynucleotit tham chiếu. Ngược lại, thuật ngữ “bổ

trợ với” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa rằng trình tự bổ trợ có độ tương đồng (hoặc đồng nhất, tức là, độ tương đồng 100%) với tất cả hoặc một phần của phần bổ sung của trình tự polynucleotit tham chiếu. Ví dụ, trình tự nucleotit “TATAC” tương đương với trình tự tham chiếu “TATAC” và bổ trợ với trình tự tham chiếu “GTATA”.

Các phần mô tả đề cập đến chiều dài khác nhau của ss hoặc dsARN nhờ đó phiên bản ngắn hơn (ngắn hơn hoặc bằng 50bp (ví dụ, 17-50)) được gọi là siARN hoặc miARN. Các phân tử ss hoặc dsARN dài hơn là 51-600 được gọi là ss hoặc dsARN, mà có thể tiếp tục được xử lý với các phân tử siARN. Theo một số phương án, trình tự axit nucleic của ss hoặc dsARN có chiều dài lớn hơn 15 bazơ hoặc cặp bazơ. Theo các phương án khác nữa, trình tự axit nucleic của ss hoặc dsARN có chiều dài từ 19 đến 25 bazơ hoặc cặp bazơ, có chiều dài từ 30 đến 100 bazơ hoặc cặp bazơ, có chiều dài từ 100 đến 250 bazơ hoặc cặp bazơ hoặc có chiều dài từ 100 đến 500 bazơ hoặc cặp bazơ. Theo các phương án khác nữa, ss hoặc dsARN có chiều dài từ 300 đến 600 bazơ hoặc cặp bazơ, có chiều dài từ 350 đến 500 bazơ hoặc cặp bazơ hoặc có chiều dài từ 400 đến 450 bazơ hoặc cặp bazơ. Theo một số phương án, ss hoặc dsARN có chiều dài là 400 bazơ hoặc cặp bazơ. Cần phải hiểu rằng mỗi khoảng riêng biệt của chiều dài ARN thể hiện một phương án riêng rẽ và khác nhau.

Việc sử dụng các ss hoặc dsARN dài (tức là, ARN lớn hơn 50bp) đã bị hạn chế do niềm tin rằng các vùng dài hơn của ARN này sẽ dẫn đến cảm ứng các đáp ứng không đặc hiệu. Tuy nhiên, việc sử dụng các ARN dài có thể có nhiều ưu điểm trong đó tế bào có thể chọn các trình tự cam tối ưu làm giảm yêu cầu đối với thử nghiệm nhiều siARN; các ss hoặc dsARN dài sẽ cho phép thư viện cam có tính phức tạp ít hơn cần thiết đối với các siARN; và, cỡ lệ quan trọng nhất là, ss hoặc dsARN dài có thể ngăn các đột biến giải thoát virus khi sử dụng làm liệu pháp điều trị.

Các nghiên cứu khác nhau chứng tỏ rằng ARN dài có thể được sử dụng để làm cam sự biểu hiện gen mà không gây ra đáp ứng áp lực hoặc gây ra các tác động xa đích đáng kể - xem ví dụ [Strat và cộng sự, *Nucleic Acids Research*, 2006, Tập 34, số 13 3803–3810; Bhargava A và cộng sự *Brain Res. Protoc.* 2004;13:115–125; Diallo M., và cộng sự, *Oligonucleotides*. 2003;13:381–392; Paddison P.J., và cộng sự, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002;99:1443–1448; Tran N., và cộng sự, *FEBS Lett.* 2004;573:127–134].

Theo một số phương án, dsARN có thể bao gồm phần kép siARN. Thuật ngữ “siARN” đề cập đến phần kép ARN ức chế nhỏ (thường nằm trong khoảng từ 17 đến 30 cặp bazơ, nhưng cũng có thể dài hơn ví dụ, 31-50bp) mà gây ra con đường can thiệp ARN (ARNi). Thông thường, siARN được tổng hợp hóa học dưới dạng 21me có vùng kép trung tâm 19bp và các phần treo-3' 2 bazơ đối xứng trên đầu tận cùng, mặc dù đã được mô tả là phần kép ARN được tổng hợp hóa học có chiều dài 25-30 bazơ có thể tăng lên nhiều gấp 100 lần khả năng so với 21me ở cùng vị trí. Hiệu lực tăng lên được quan sát thu được sử dụng ARN dài hơn trong việc kích hoạt ARNi được giả định là kết quả từ việc tạo ra Dicer có cơ chất (27me) thay vì sản phẩm (21me) và điều này cải thiện tốc độ và hiệu quả xâm nhập của phần kép siARN vào trong RISC.

Đã phát hiện ra rằng vị trí phần treo-3' ảnh hưởng đến hiệu lực của siARN và phần kép đối xứng có phần treo-3' trên sợi đối nghĩa thường có hiệu lực hơn phần treo-3' trên sợi có nghĩa (Rose và cộng sự, 2005). Điều này có thể được cho là sợi không đối xứng tải vào trong RISC, khi các mẫu hiệu quả đối xứng được quan sát khi nhắm trúng đích bản sao đối nghĩa.

Các sợi của ARN can thiệp sợi kép (ví dụ, siARN) có thể được kết nối để tạo ra dạng kẹp tóc hoặc cấu trúc vòng lặp gốc (ví dụ, shARN). Do đó, như được đề cập, dsARN theo một số phương án của sáng chế có thể cũng là ARN dạng kẹp tóc ngắn (shARN). ARN dạng kẹp tóc ngắn (shARN) cũng có thể do sự bắt cặp bazơ vòng lặp và cặp bazơ gốc bên trong ARN sợi đơn theo sáng chế.

Thuật ngữ “shARN”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến tác nhân ARN có cấu trúc vòng lặp gốc, bao gồm vùng thứ nhất và thứ hai của trình tự hỗ trợ, mức độ hỗ trợ và định hướng của vùng là đủ sao cho sự bắt cặp bazơ xảy ra giữa các vùng, vùng thứ nhất và vùng thứ hai được kết hợp với nhau bằng vùng vòng lặp, vòng lặp là do thiếu cặp bazơ giữa các nucleotit (hoặc tương tự nucleotit) trong vùng vòng lặp gốc. Số lượng nucleotit trong vòng lặp nằm trong khoảng từ 3 đến 23, hoặc từ 5 đến 15, hoặc từ 7 đến 13, hoặc từ 4 đến 9, hoặc từ 9 đến 11. Cần phải hiểu rằng mỗi khoảng được lưu ý ở trên thể hiện các phương án riêng biệt theo sáng chế. Một số nucleotit trong vòng lặp có thể tham gia vào tương tác cặp bazơ với các nucleotit khác trong vòng lặp. Các ví dụ về các trình tự oligonucleotit có thể được sử dụng tạo ra vòng lặp 5'-UUCAAGAGA-3' (SEQ ID NO: 44) (Brummelkamp, T. R. và cộng sự (2002) Science 296: 550) và 5'-UUUGUGUAG-3' (SEQ ID NO: 45) (Castanotto, D. và cộng sự (2002)

ARN 8:1454). Như được thừa nhận bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này oligonucleotit mạch đơn kết quả tạo ra cấu trúc dạng kẹp tóc hoặc dạng vòng lặp gốc chứa vùng sợi kép có thể tương tác với cơ chế ARNi.

Theo sự mô tả này, các phân tử ss hoặc dsARN có thể xuất hiện tự nhiên hoặc tổng hợp.

Sự tổng hợp ARN thích hợp sử dụng theo một số phương án của sáng chế có thể bị ảnh hưởng như sau. Thứ nhất, trình tự mARN đích (ví dụ, mARN của virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi) được quét tại phần cuối của mã bộ ba bắt đầu AUG cho các trình tự hai nucleotit AA. Sự xuất hiện của mỗi AA và 19 nucleotit liền kề 3' được gọi là các vị trí đích siARN tiềm năng. Tốt hơn là, các vị trí đích siARN được chọn từ khung đọc mở, khi các vùng không dịch mã (UTR) giàu hơn trong vị trí liên kết protein điều hòa. Các protein liên kết UTR và phức hợp bắt đầu dịch mã có thể can thiệp vào liên kết của phức hợp siARN endonucleaza [Tuschl ChemBiochem. 2:239-245]. Cần phải hiểu rằng, mặc dù, các siARN điều khiển vùng không dịch mã có thể cũng có hiệu quả, như được giải thích cho GAPDH, trong khi siARN được định hướng tại 5'UTR được qua trung gian làm giảm khoảng 90% trong GAPDH mARN tế bào và loại bỏ hoàn toàn mức protein (xem Ambion website- techlib 91/912).

Thứ hai, vị trí đích tiềm năng được so sánh với dữ liệu bộ gen thích hợp (ví dụ, động vật giáp xác) sử dụng phần mềm sắp xếp trình tự bất kỳ, như phần mềm BLAST có sẵn từ trang chủ NCBI ([www\(dot\)ncbi\(dot\)nml\(dot\)nih\(dot\)gov/BLAST/](http://www(dot)ncbi(dot)nml(dot)nih(dot)gov/BLAST/)). Các vị trí đích giả định biểu hiện tính đồng dạng đáng kể với các trình tự mã hóa khác được xác định và lọc ra.

Do đó, theo một số phương án, ít nhất một ARN bổ sung ít nhất một phần với phân tử axit nucleic đích, hoặc liên kết với phân tử đích thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ, hoặc có ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liền kề của phân tử mARN đích không có tính đồng nhất đáng kể bất kỳ với các trình tự gen vật chủ là động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh.

Các trình tự đích định lượng được chọn làm khung cho tổng hợp siARN. Các trình tự ưu tiên là các trình tự chứa hàm lượng G/C là thành phần được chứng tỏ là có hiệu quả trong việc gián tiếp làm câm gen so với các trình tự có hàm lượng G/C cao hơn 55%. Một số vị trí đích tốt hơn được chọn dọc theo chiều dài của gen đích để định lượng.

Để đánh giá tốt hơn về các siARN được chọn, đối chứng âm tốt hơn được sử dụng liên hợp. siARN đối chứng âm có thể bao gồm thành phần nucleotit giống với siARN nhưng thiếu tính tương đồng đáng kể với bộ gen. Do vậy, trình tự nucleotit bị xáo trộn của siARN thường được sử dụng, miễn là nó không thể hiện bất kỳ tính tương đồng đáng kể nào với gen khác bất kỳ.

Ss hoặc dsARN có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm tổng hợp enzym hoặc tổng hợp pha rắn. Đặc biệt hiệu quả trong trường hợp trình tự polynucleotit có hoặc không có các cải biến như được giải thích ở trên. Thiết bị và các chất phản ứng để thực hiện tổng hợp pha rắn được bán sẵn từ, ví dụ, Applied Biosystems. Các phương thức bất kỳ khác để tổng hợp có thể cũng được sử dụng; tổng hợp các oligonucleotit thực là đã biết đến trong khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện thông qua các kỹ thuật được thiết lập, cụ thể, ví dụ, Sambrook, J. và Russell, D. W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. và cộng sự, eds. (1994, 1989), "Current Protocols in Molecular Biology," Volumes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular Cloning," John Wiley & Sons, New York; và Gait, M. J., ed. (1984), "Oligonucleotide Synthesis"; sử dụng hóa chất pha rắn, ví dụ, xyanoethyl phosphoramidit sau đó là khử bảo vệ, khử muối, và tinh sạch bằng, ví dụ, phương pháp trityl-on tự động hoặc HPLC.

Ss hoặc dsARN có thể là hỗn hợp của các phân tử dsARN ngắn và dài như, dsARN, siARN, siARN+dsARN, siARN+miARN, hpARN hoặc tổ hợp của chúng. Theo phương án cụ thể, dsARN là siARN (100%). Các hạt nano chitosan-ARN có thể cũng bao gồm hỗn hợp của ARN sợi đơn có nghĩa và đối nghĩa.

Cần phải hiểu rằng ss hoặc dsARN theo một số phương án của sáng chế không phải chỉ giới hạn ở các phân tử chỉ chứa ARN, mà còn bao gồm các nucleotit biến đổi hóa học hoặc và không phải nucleotit.

Theo một số phương án, ARN được đề xuất trong bản mô tả này có thể kết hợp chức năng với peptit xâm nhập tế bào. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "peptit xâm nhập tế bào" là peptit chứa các trình tự axit amin ngắn (khoảng từ 12-30 gốc) hoặc mô tip chức năng có các đặc tính vận chuyển năng lượng độc lập (tức là, không qua nhập bào) liên quan đến vận chuyển phức hợp thấm màng đi qua màng plasma và/hoặc

màng nhân của tế bào. Peptit xâm nhập tế bào được sử dụng trong phức hợp thẩm màng theo một số phương án của sáng chế tốt hơn bao gồm ít nhất một gốc cystein không thực hiện chức năng, là tự do hoặc được dẫn xuất tạo ra liên kết disulfua với axit ribonucleic sợi kép đã được biến đổi đối với liên kết này. Các mô típ axit amin đại diện có các tính chất này được liệt kê trong patent Mỹ số 6,348,185, nội dung của patent được kết hợp vào trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các peptit xâm nhập tế bào theo một số phương án của sáng chế tốt hơn là bao gồm, nhưng không giới hạn ở, penetratin, transportan, pIsl, TAT(48-60), pVEC, MTS, và MAP. Mặt khác, theo một số phương án, việc sử dụng peptit xâm nhập tế bào hoặc chất biến nạp là không mong muốn, do vậy, theo một số phương án, dsARN đề xuất thiếu, không có peptit xâm nhập tế bào hoặc dạng khác bất kỳ của chất xâm nhập tế bào, chất tăng cường biến nạp. Lưu ý rằng, trong văn cảnh của sáng chế, peptit xâm nhập tế bào, chất xâm nhập tế bào và chất tăng cường biến nạp không bao gồm chitosan hoặc polyme như polyetylen glycol (PEG).

Theo phương án khác, ss hoặc dsARN có thể là tiền chất microARN hoặc “pri-miARN”.

Thuật ngữ “microARN”, “miARN”, và “miR” là đồng nghĩa và đề cập đến tập hợp các phân tử ARN sợi đơn không mã hóa có chiều dài khoảng từ 19 đến 28 nucleotit, mà điều hòa biểu hiện gen. Các miARN được phát hiện phổ biến ở nhiều sinh vật (viruses.fwdarw.humans) và đã được chứng minh là có vai trò trong sự phát triển, sự cân bằng nội mô, và nguyên nhân bệnh.

Dưới đây, phần mô tả ngắn gọn về cơ chế hoạt tính miARN.

Gen mã hóa cho miARN được phiên mã dẫn đến sự tạo ra tiền chất miARN “pri-miARN”. pri-miARN thường là một phần của ARN nhiều xistron chứa nhiều pri-miARN. pri-miARN có thể tạo ra dạng kẹp tóc có gốc và vòng lặp. Gốc có thể bao gồm các bazơ không bắt cặp.

Cấu trúc dạng kẹp tóc của pri-miARN nhận biết bởi Drosha, là RNaza III endonucleaza. Drosha thường nhận biết các vòng lặp đầu tận cùng trong pri-miARN và phân cắt xấp xỉ hai lượt xoắn ốc thành gốc tạo ra tiền chất gồm 60-70 nucleotit được gọi là pre-miARN. Drosha phân cắt pri-miARN với việc cắt so le thường bằng các RNaza III endonuleaze tạo ra các vòng lặp gốc pre-miARN có gốc photphat 5' và phần treo 3' ~2 nucleotit. Đã được đánh giá rằng xấp xỉ một vòng xoắn của gốc (~10 nucleotit) kéo

dài ra xa vị trí phân cắt Drosha là cần thiết cho quá trình xử lý hiệu quả. pre-miARN sau đó được vận chuyển chủ động từ nhân đến tế bào chất bởi Ran-GTP và thụ thể xuất bào Exportin-5.

Gốc sợi kép của pre-miARN sau đó được nhận biết bởi Dicer, cùng là RNaza III endonucleaza. Dicer cũng nhận biết gốc photphat 5' và phần treo 3' tại các bazơ của vòng lặp gốc. Sau đó, Dicer phân cắt hai vòng xoắn ốc vòng lặp đầu tận cùng ra xa bazơ của vòng lặp gốc để lại gốc photphat 5' và phần treo 3' ~2 nucleotit bổ sung. siARN dạng kép thu được, có thể bao gồm phần không khớp, bao gồm miARN hoàn chỉnh và đoạn kích thước tương tự được gọi là miARN*. miARN và miARN* có thể có nguồn gốc từ các cánh đối diện của pri-miARN và pre-miARN. Các trình tự miARN* có thể được tìm thấy trong các thư viện của miARN được tách dòng nhưng thường với tần suất thấp hơn miARN.

Mặc dù, ban đầu có mặt dưới dạng các mảnh sợi kép có miARN*, nhưng cuối cùng miARN được kết hợp dưới dạng ARN sợi đơn thành phức hợp ribonucleoprotein được gọi là phức hợp cảm ứng ARN (RISC - RNA-induced silencing complex). Các protein khác nhau có thể tạo ra RISC, mà có thể dẫn đến sự biến đổi tính đặc hiệu đối với các phần kép miARN/miARN*, vị trí liên kết của gen đích, hoạt tính miARN (triệt hoặc hoạt hóa), và sợi của phần kép miARN/miARN* được nạp vào trong RISC.

Khi sợi miARN của phần kép miARN:miARN* được nạp vào trong RISC, thì miARN* được loại bỏ và phân hủy. Sợi của phần kép miARN:miARN* được tải vào trong RISC là sợi mà có đầu 5' được bắt cặp ít chắc chắn. Trong trường hợp mà cả hai đầu của miARN:miARN* có sự bắt cặp đầu 5' tương đối nghiêm ngặt, cả miARN và miARN* có thể có hoạt tính cảm gen.

RISC nhận biết các axit nucleic đích trên cơ sở các mức độ hỗ trợ cao giữa miARN và mARN, đặc biệt bởi các nucleotit 2-7 của miARN.

Nhiều nghiên cứu đã xem xét về điều kiện bắt cặp bazơ giữa miARN và đích mARN của nó để đạt được sự ức chế hiệu quả quá trình dịch mã (đánh giá bởi Bartel 2004, Cell 116-281). Trong các tế bào động vật có vú, 8 nucleotit đầu tiên của miARN có thể quan trọng (Doench & Sharp 2004 GenesDev 2004-504). Tuy nhiên, các phần khác của microARN cũng tham gia và liên kết mARN. Hơn nữa, sự bắt cặp bazơ đầy đủ tại đầu 3' có thể được bù cho sự bắt cặp bazơ không đầy đủ tại đầu 5' (Brennecke và

cộng sự, 2005 PLoS 3-e85). Các nghiên cứu tính toán, phân tích liên kết miARN trên toàn bộ bộ gen đã đưa ra vai trò cụ thể đối với các bazơ 2-7 tại đầu 5' của miARN trong liên kết đích chứ không phải là vai trò của nucleotit đầu tiên, được phát hiện thường là "A" cũng được nhận biết (Lewis và cộng sự 2005 Cell 120-15). Tương tự, các nucleotit 1-7 hoặc 2-8 được sử dụng để xác định và xác nhận đích bởi Krek và cộng sự (2005, Nat Genet 37-495).

Các vị trí đích trong mARN có thể là 5' UTR, 3' UTR hoặc trong vùng mã hóa. Thú vị là, nhiều miARN có thể điều hòa cùng một đích mARN bằng cách nhận dạng cùng một vị trí hoặc nhiều vị trí. Sự có mặt của nhiều vị trí liên kết miARN trong hầu hết các đích được xác định về mặt di truyền học có thể chỉ ra rằng hoạt động hợp tác của nhiều RISC tạo nên sự ức chế dịch mã hiệu quả nhất.

Các miARN có thể điều khiển RISC giảm điều hòa biểu hiện gen bằng hai cơ chế: phân tách mARN hoặc kiểm chế dịch mã. miARN có thể xác định sự phân tách ra của mARN nếu mARN có mức độ bổ sung nhất định với miARN. Khi miARN dẫn sự phân tách, sự cắt thường là giữa các nucleotit bắt cặp với các gốc 10 và 11 của miARN. Ngoài ra, miARN có thể kiểm chế dịch mã nếu miARN không có mức độ bổ trợ cần thiết với miARN. Sự kiểm chế dịch mã có thể thấy nhiều hơn ở động vật do động vật có thể có mức độ bổ trợ thấp hơn giữa miARN và vị trí liên kết.

Cần lưu ý rằng có thể có sự thay đổi tại các đầu 5' và đầu 3' của cặp miARN và miARN* bất kỳ. Sự thay đổi này có thể do sự thay đổi việc xử lý emzym của Drosha và Dicer liên quan đến vị trí phân tách. Sự thay đổi tại đầu 5' và đầu 3' của miARN và miARN* cũng có thể là do sự bắt cặp sai trong cấu trúc gốc của pri-miARN và pre-miARN. Sự bắt cặp sai của sợi gốc có thể dẫn đến tập hợp các cấu trúc dạng kẹp tóc khác nhau. Sự thay đổi trong cấu trúc gốc cũng có thể dẫn đến sự thay đổi sản phẩm phân tách bởi Drosha và Dicer.

Do đó, theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN bao gồm ít nhất một trình tự ARN có thể liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi, và cụ thể là động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh. mARN đích có thể là bản sao của trình tự gen bất kỳ của virus gây bệnh. Các gen từ các virus gây bệnh có trình tự bổ trợ với trình tự mARN đích là các gen đích được đề cập, miễn là trình tự đích không tương đồng đáng kể với gen vật chủ.

Theo phương án khác, hạt nano chitosan-dsARN bao gồm ít nhất một trình tự ARN bổ sung ít nhất một phần với mARN đích của virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi, và cụ thể là động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh.

Theo phương án khác nữa, hạt nano chitosan-dsARN bao gồm ít nhất một trình tự ARN tương đồng ít nhất là 90% với mARN đích của virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi, và cụ thể là động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “gen đích của tác nhân gây bệnh” hoặc “gen đích của virus” được xác định là gen virus, biểu hiện của nó chủ yếu là tính độc, phát triển hoặc gây bệnh của virus. Thuật ngữ “gen” được sử dụng rộng rãi đề cập đến đoạn bất kỳ của axit nucleic virus liên quan đến chức năng sinh học. Do đó, các gen bao gồm các trình tự mã hóa và/hoặc trình tự điều hòa cần thiết cho biểu hiện của chúng. Ví dụ, gen đề cập đến đoạn axit nucleic biểu hiện mARN hoặc ARN chức năng, và tùy ý mã hóa protein cụ thể.

Gen đích của tác nhân virus gây bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gen cấu trúc cho protein virion, gen cho protein chức năng (ví dụ, gen liên quan đến sao chép) và trình tự khác liên quan đến bệnh hoặc triệu chứng bệnh ở giáp xác vật chủ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “sản phẩm gen của tác nhân virus gây bệnh” đề cập đến sản phẩm biểu hiện của gen của tác nhân virus gây bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở bản sao ARN của gen của tác nhân virus gây bệnh, và peptit hoặc polypeptit mã hóa trình tự gen của tác nhân virus gây bệnh.

Điều trị hoặc phòng ngừa lây nhiễm tác nhân virus gây bệnh đạt được bằng cách giảm biểu hiện gen của tác nhân virus gây bệnh. Do đó, theo một số phương án, ít nhất một gen của tác nhân virus gây bệnh là gen virus có sự biểu hiện được bắt đầu và gia tăng trong quá trình lây nhiễm tác nhân virus gây bệnh. Ví dụ, Tsai và cộng sự (J Virol 204, 78:11360-370) bộc lộ gen virus gây bệnh đốm trắng, sự biểu hiện của gen này có thể bị thay đổi (ví dụ, giảm đi) trong quá trình lây nhiễm tác nhân virus gây bệnh.

Bảng I đưa ra danh sách không giới hạn về bệnh do virus và hệ gen virus liên quan đến bệnh của động vật giáp xác được nuôi bao gồm các trình tự có thể là các đích để làm giảm biểu hiện bởi hạt nano chitosan-dsARN theo sáng chế.

Bảng I: Bệnh và virus gây bệnh đối với nghề nuôi trồng thủy sản

Cơ thể vật chủ	Bệnh	Tác nhân gây bệnh (loại cơ thể)	Số truy cập hệ gen
Động vật giáp xác	Hoại tử tủy lây nhiễm (IPN)	Virut IPN	NC 001915.1(A) NC 001916.1(B)
Động vật giáp xác	Virut liên quan đến mang (GAV)	Virut GAV	NC_010306.1
Động vật giáp xác	Hoại tử sinh huyết và dưới da lây nhiễm (IHHN)	Virut IHHN	NC_002190
Động vật giáp xác	Hoại tử cơ lây nhiễm (IMN)	Virut IMN	KR815474.1
Động vật giáp xác	Bệnh hoại tử cơ quan tạo máu (IHNV)	Virut IHNV	X89213
Động vật giáp xác	Hội chứng Taura	Virut gây hội chứng Taura	NC_003005
Động vật giáp xác	Bệnh đốm trắng	Virut WSS (ADN virut)	AF332093
Động vật giáp xác	Bệnh đuôi trắng (bệnh cơ trắng aka)	Macrobracium rosenbergii nodavirus (MrN Virus)	NC_005094.1(1) NC-005095.1(2)
Động vật giáp xác	Bệnh đầu vàng	Virut YH (virut ssARN)	FJ848673.1

Theo một phương án, ít nhất một gen của tác nhân virut gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm protein (hoặc capsit), enzym của sự sao chép virut (ví dụ, ARN polymeraza virut, helicaza), proteaza virut và protein liên kết chitin. Do đó, hạt nano chitosan-dsARN có thể chứa ít nhất một trình tự ARN bổ sung hoặc có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với trình tự mARN của ít nhất một vỏ hoặc capsit virut, và/hoặc ít nhất một enzym virut của sự sao chép virut, và/hoặc ít nhất một proteaza virut và/hoặc ít nhất một protein liên kết chitin virut.

Bảng II đưa ra danh sách không toàn bộ của một số gen (và phân loại của chúng) của các virut gây bệnh theo bảng I, có thể là các đích (ví dụ, sản phẩm gen đích) để giảm biểu hiện bằng hạt nano chitosan-dsARN được mô tả trong bản mô tả này.

Bảng II: Danh sách một phần của các gen của tác nhân virut gây bệnh từ virut giáp

xác.

Seq ID NO:	Ký hiệu gen	Gen	Phân loại
1	DQ681069	Protein capsit virut 28 (VP28)	Vỏ (capsit)
2	DQ681071	Protein capsit virut 19 (VP19)	Vỏ (capsit)
3	AF144620	Ribonucleotit reductaza 2	Không xác định
4	FJ756475	Thymidin kinaza thymidylat kinaza	Không xác định
5	DQ121373	WSV477	Không xác định
6	AY220746.1	VP26	Vỏ (capsit)
7	AF510518	Protein vỏ của virut gây hội chứng Taura 1 (VP1)	Vỏ (capsit)
8	JQ356865	Protein capsit của virut gây hội chứng Taura 2 (CP2)	Vỏ (capsit)
9	EU977579	YHV RNA-phụ thuộc ARN polymeraza	Enzym của sự sao chép virut
10	EU977580	YHV helicaza	Enzym của sự sao chép virut
11	EU977577	YHV proteaza	Proteaza virut
12	EU784973	Gen GAV pplab	Enzym của sự sao chép virut
13	KT316281	GAV polyprotein pp3	Vỏ (capsit)
14	KF278563	Polyprotein 1b của GAV replicaza	Enzym của sự sao chép virut
15	DQ978362	Gen GAV glycoprotein 64	Vỏ (capsit)
16	EU977581	Gen GAV nucleocapsit	Vỏ (capsit)
17	EU977578	Polyprotein 1ab của GAV YHV-PmA replicaza	Enzym của sự sao chép virut
18	KT316282	Glycoprotein cấu trúc của vỏ GAV	Vỏ (capsit)
19	JN616415	IHHNV NS1, IHHNV NS2, protein capsit	Vỏ (capsit)
20	KJ636783	Hoại tử cơ lây nhiễm ở tôm he ORF1/ORF2	Vỏ (capsit) và enzym của sự sao chép virut
21	D26527	IPNV RNA-phụ thuộc ARN polymeraza	Enzym của sự sao chép virut

22	JX083063	Protein capsit IPNV VP2	Vỏ (capsit)
23	KC710379	IPNV VP4	Proteaza virut
24	L40580	IPNV VP5	Proteaza virut

Cần phải hiểu rằng mỗi gen hoặc trình tự được bộc lộ trong bảng II thể hiện phương án riêng biệt của sáng chế.

Theo một số phương án, ARN bao gồm trình tự axit nucleic làm giảm hiệu quả sản phẩm gen của gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa protein capsit virut 28 (VP28), gen mã hóa protein capsit virut 19 (VP19), gen mã hóa ribonucleotit reductaza 2 (rr2) và gen virut đốm trắng WSV477. Theo một số phương án, sản phẩm của gen mã hóa protein capsit virut WSSV 28 được mã hóa bởi SEQ ID NO: 1, hoặc một phần của nó, sản phẩm của gen mã hóa protein capsit virut WSSV 19 được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2, hoặc một phần của nó, sản phẩm của gen mã hóa protein WSSV ribonucleotit reductaza 2 (rr2) được mã hóa bởi SEQ ID NO: 3, hoặc một phần của nó và sản phẩm của gen WSV477 được mã hóa bởi SEQ ID NO: 5 hoặc một phần của nó. Ví dụ, ss hoặc dsARN được nhắm trúng đích tác nhân virut gây bệnh của động vật giáp xác được nuôi có thể là ss hoặc dsARN đặc hiệu WSSV tương ứng với các trình tự WSSV SEQ ID NO: 1 và 2. Ss hoặc dsARN thích hợp bổ sung được nhắm trúng đích tác nhân virut gây bệnh có thể được thiết kế theo các trình tự từ virut bất kỳ gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi, ví dụ, các trình tự cụ thể trong bảng II.

Hạt nano chitosan ss hoặc dsARN theo sáng chế có thể được sử dụng để làm chậm sự biểu hiện của gen vật chủ nội sinh ở động vật giáp xác được nuôi. Do đó, theo một số phương án, ít nhất một ARN bao gồm ít nhất một trình tự liên kết, bổ sung ít nhất một phần hoặc ít nhất 90% tương đồng với phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi hoặc động vật giáp xác được nuôi sống thủy sinh. Các mARN nội sinh của động vật giáp xác được nuôi thủy sinh được nhắm trúng đích đến sử dụng dsARN có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dsARN có sự biểu tượng quan với tính trạng kiểu hình không mong muốn, hoặc các dsARN có sự biểu hiện liên quan đến tính miễn cảm, đáp ứng với hoặc kháng với lây nhiễm bởi các virut bất kỳ gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi. Các mARN ví dụ có thể nhắm trúng đích là các gốc nhận dạng virut mã hóa, có sự chậm không gây hại cho động vật giáp xác vật chủ. Theo các phương án khác, dsARN được định hướng đến mARN đích của động vật giáp xác được nuôi

sống thủy sinh tạo ra bước điều hòa quy trình hoặc con đường mong muốn, sự cân của nó làm tăng hoạt tính của con đường này.

Các đích này có thể bao gồm mARN của thành phần điều hòa âm như các nhân tố sao chép và các con đường tín hiệu, mARN của thụ thể chịu trách nhiệm làm giảm điều hòa của các con đường mong muốn, v.v.. Các đích nội sinh mong muốn khác để ức chế biểu hiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các gen và các con đường chịu trách nhiệm đối với sự tăng sinh trưởng, tăng tốc độ sinh trưởng, cải thiện chuyển đổi thức ăn, nhắm trúng đích xác định giới tính trong quá trình phát triển, ảnh hưởng mùi vị, áp lực (nhiệt độ, độ mặn, độc tính, hàm lượng oxy thấp, bệnh, vật ký sinh, v.v.), sức đề kháng hoặc tính dung nạp, hành vi sinh sản và thậm chí sự thuần hóa của loài vẫn chưa được nuôi dễ dàng. Theo một phương án cụ thể, đích gen vật chủ nội sinh là gen Rab7 tôm, mã hóa protein liên kết VP-28, protein virus liên quan đến Ras đã được phát hiện trong virus gây bệnh đốm trắng (WSSV). Theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN bao gồm ít nhất một trình tự bổ trợ hoặc liên kết với trình tự mARN của protein liên quan đến Ras *Litopenaeus vannamei* (Rab7, số truy cập # JQ581679, SEQ ID NO: 25). Theo các phương án khác, hạt nano chitosan-dsARN bao gồm dsARN có trình tự liên kết với, ít nhất một phần bổ trợ với hoặc ít nhất 90% tương đồng với SEQ ID NO: 47 của mARN Rab7.

Cũng bao gồm là các hạt nano chitosan-ARN chứa nhiều ARN. Do đó, theo một số phương án, dsARN của hạt nano chitosan-dsARN có thể là đồng dạng, tức là, tất cả bổ sung, liên kết hoặc ít nhất là 90% tương đồng với cùng một trình tự phân tử đích mARN của tác nhân virus gây bệnh. Ngoài ra, ss hoặc dsARN của hạt nano chitosan-ARN có thể là đồng dạng, ví dụ, bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với hai hoặc nhiều trình tự của phân tử đích mARN của tác nhân virus gây bệnh. Theo các phương án khác, ss hoặc dsARN có thể bao gồm các trình tự bổ trợ, liên kết hoặc ít nhất là 90% tương đồng với các phân tử mARN khác nhau của cùng một tác nhân virus gây bệnh. Ví dụ, theo một phương án cụ thể, ARN của hạt nano chitosan-ARN được mô tả trong bản mô tả này chứa các trình tự bổ trợ, liên kết, hoặc ít nhất là 90% tương đồng với một, hai, ba hoặc nhiều trình tự bất kỳ của WSSV. Theo một số phương án, ARN chứa các trình tự bổ trợ, liên kết hoặc ít nhất là 90% tương đồng với một hoặc nhiều SEQ ID No. 1, 2, 3 và 5 bất kỳ. Do vậy, các trình khác có thể bổ sung, liên kết hoặc ít nhất là 90% tương đồng với cùng một mARN đích, nhưng từ các đoạn khác của nó, hoặc

các trình tự khác có thể bổ sung hoặc liên kết với các mARN đích khác nhau và riêng biệt từ cùng một tác nhân virus gây bệnh.

Cũng bao gồm các hạt nano chitosan-ARN trong đó dsARN của hạt nano chitosan-ARN chứa ss hoặc dsARN bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với một hoặc nhiều trình tự nucleotit của phân tử đích mARN của hai hoặc nhiều tác nhân virus gây bệnh khác nhau. Ví dụ, theo một phương án, ARN của hạt nano chitosan-dsARN được mô tả trong bản mô tả này chứa các trình tự bổ trợ, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với mỗi một trong số các trình tự từ WSSV, GAV, INPV hoặc virus khác gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi. Cần phải hiểu rằng ss hoặc dsARN của hạt nano như được mô tả trong bản mô tả này có thể chứa trình tự bổ trợ, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với tất cả các thành phần kết hợp của mARN đích, ví dụ, một hoặc nhiều trình tự từ mARN đích cùng với một hoặc nhiều trình tự từ một hoặc nhiều mARN đích khác. Cũng bao gồm các hạt nano chitosan-ARN chứa các trình tự ARN hướng đến nhiều đích. dsARN này được định hướng đến các đích chứa các trình tự dsARN liên kế được xây dựng bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với nhiều hơn một trình tự đích ví dụ, tất cả các SEQ ID NO: 1, 2, 3 của WSSV nằm trên cùng một ss hoặc dsARN polynucleotit, mà khi được xử lý, có thể tạo ra siARN bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với nhiều đích của WSSV. Ưu điểm của sự kết hợp này như được mô tả trong bản mô tả này là, ngoài những ưu điểm khác, hiệu quả về kinh tế trong sản xuất và đơn giản trong quá trình thực hiện của chitosan-ARN sử dụng ss hoặc dsARN.

Ngoài ra, còn bao gồm các hạt nano chitosan-ARN chứa các ss hoặc dsARN bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với mARN đích của một hoặc nhiều tác nhân virus gây bệnh của nhiều hơn một loài của động vật giáp xác được nuôi. Do đó, các hạt nano chitosan-dsARN, ví dụ, dsARN bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với mARN đích của các virus gây bệnh cho một hoặc nhiều *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* và/hoặc *Macrobrachium rosenbergii* bất kỳ. Ngoài ra, dsARN có thể bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với các tác nhân virus gây bệnh của các lớp giáp xác được nuôi khác nhau, ví dụ, ss hoặc dsARN nhắm trúng đích các virus của cũng như virus tôm hùm. Nhiều hạt nano chitosan-ARN được nhắm trúng đích có thể đặc biệt hiệu quả trong hệ thống nuôi trồng thủy sản đa năng tích hợp, trong đó nhiều hơn một động vật giáp xác được nuôi cùng nhau.

Do đó, theo một số phương án, ARN bao gồm các trình tự axit nucleic bổ trợ, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với trình tự axit nucleic của gen mã hóa protein capsit virus gây bệnh đốm trắng 28 (VP28), gen mã hóa protein capsit virus 19 (VP 19), gen mã hóa ribonucleotit reductaza 2 (rr2) và gen virus gây bệnh đốm trắng WSV477. Theo các phương án cụ thể, WSSV nhắm trúng đích ARN bao gồm ss hoặc dsARN bổ sung, liên kết hoặc ít nhất 90% tương đồng với trình tự ARN WSSV được chọn từ nhóm bao gồm trình tự VP28 SEQ ID NO: 59, trình tự VP28 SEQ ID NO: 64 hoặc 65, trình tự Rr2 SEQ ID NO: 78 và trình tự Wsv477 SEQ ID NO: 79.

Theo một số phương án, WSSV nhắm trúng đích ARN bao gồm ss hoặc dsARN bổ sung hoặc ít nhất 90% tương đồng với nhiều hơn một trình tự ARN WSSV, ví dụ, với tổ hợp của hai hoặc nhiều trình tự WSSV (ví dụ, VP28, VP29, Rr2, Wsv477). Theo các phương án cụ thể, WSSV nhắm trúng đích bao gồm ss hoặc dsARN bổ trợ với hoặc ít nhất 90% tương đồng với một phần của hỗn hợp trình tự WSSV (ví dụ, SEQ ID NO: 66). Theo phương án cụ thể, WSSV nhắm trúng đích ARN bao gồm ss hoặc ds ARN bổ sung hoặc ít nhất 90% tương đồng với trình tự hợp nhất VP28-VP19 SEQ ID NO: 77.

Theo các phương án khác nữa, hạt nano chitosan-ARN bao gồm ít nhất một ss hoặc dsARN bổ sung chứa ít nhất một trình tự bổ trợ có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ hoặc ít nhất 90% tương đồng với phân tử mRNA đích của động vật giáp xác được nuôi. Theo các phương án khác, hạt nano chitosan-ARN bao gồm ít nhất một ss hoặc dsARN bổ sung chứa ít nhất một trình tự bổ trợ bổ sung ít nhất một phần với hoặc ít nhất 90% tương đồng với phân tử mRNA đích của động vật giáp xác được nuôi.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, sự tổng hợp ss hoặc dsARN thích hợp để sử dụng theo sáng chế có thể bị ảnh hưởng theo các trình tự đích của tác nhân virus gây bệnh đã biết kết hợp vào trong hệ gen vật chủ, các trình tự đích nghi ngờ liên quan đến sức đề kháng lây nhiễm tác nhân virus gây bệnh, trình tự đích biểu diễn vùng xen kẽ của hệ gen tác nhân virus gây bệnh và các trình tự của tác nhân gây bệnh cụ thể đã được minh họa quyết định sự phát triển và/hoặc sao chép của tác nhân gây bệnh. Cần phải hiểu rằng, theo phương án khác của sáng chế, ss hoặc dsARN hướng tới các trình tự có tính tương đồng bảo thủ giữa các chủng khác nhau của tác nhân virus gây bệnh, hoặc thậm chí giữa các tác nhân virus gây bệnh khác, khi các trình tự này được xác định, có thể có hiệu quả chống lại nhiều hơn một chủng tác nhân virus gây bệnh, hoặc thậm

chí chống lại các virus khác nhau.

Cần phải hiểu từ phần mô tả ở trên, sự tiếp xúc các tế bào giáp xác thủy sinh với miARN có thể được thực hiện theo nhiều cách:

1. Chuyển nạp tạm thời các tế bào chủ với miARN sợi kép trưởng thành;
2. Chuyển nạp ổn định hoặc tạm thời các tế bào chủ có vector biểu hiện mã hóa miARN trưởng thành;
3. Chuyển nạp ổn định hoặc tạm thời các tế bào chủ có vector biểu hiện mã hóa pre-miARN. Trình tự pre-miARN có thể bao gồm từ 45-90, 60-80 hoặc 60-70 nucleotit. Trình tự của pre-miARN có thể bao gồm miARN và miARN* như được đề cập trong bản mô tả này. Trình tự của pre-miARN cũng có thể là trình tự của pri-miARN ngoại trừ từ 0 đến 160 nucleotit từ đầu 5' và đầu 3' của pri-miARN. Trình tự của pre-miARN có thể bao gồm trình tự của các SEQ ID NO: 5-10 hoặc biến thể của chúng;
4. Chuyển nạp ổn định hoặc tạm thời tế bào chủ có vector biểu hiện mã hóa pri-miARN. Trình tự pri-miARN có thể bao gồm từ 45-30.000, 50-25.000, 100-20.000, 1.000-1.500 hoặc 80-100 nucleotit. Trình tự của pri-miARN có thể bao gồm pre-miARN, miARN và miARN*, như được đề cập trong bản mô tả này và biến thể của chúng.

Sáng chế đề xuất phương pháp để điều chế các hạt nano chitosan-ARN như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án của sáng chế, chitosan được khử axetyl hóa một phần có thể được tạo ra bằng cách hòa tan chitosan (ví dụ, chitosan 80/20 trọng lượng phân tử 40-150kDa) trong axit axetic, bổ sung anhydrit axetic, khuấy (ở nhiệt độ phòng hoặc cao hơn, ví dụ, 40°C) khi cần thiết (ví dụ, trong 12 giờ), và dừng phản ứng bằng trung hòa với bazơ mạnh (ví dụ, NaOH). Chitosan kết tủa, và bây giờ chitosan được khử axetyl hóa một phần có thể thu hồi bằng ly tâm và rửa lặp lại và thẩm tách chống nước để loại bỏ tạp chất. Sau đó, chitosan được khử axetyl hóa một phần có thể được làm đông khô để lưu trữ.

Khi mức độ khử axetyl hóa chitosan phụ thuộc vào tỉ lệ mong của anhydrit axetic và chitosan, có thể bổ sung lượng lớn hơn của anhydrit axetic để tạo chitosan được khử axetyl hóa một phần nhiều hơn. Theo một số phương án, tỉ lệ mol anhydrit axetic/chitosan (Ac_2O) được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 0 đến 500, để giảm mức

độ khử axetyl hóa từ khoảng 82% (Ac_2O là 0, không bổ sung Ac_2O) xuống 35% (tỉ lệ mol xấp xỉ 375), có độ dốc tuyến tính nằm giữa hai giá trị.

Theo một số phương án, chế phẩm có tỉ lệ khối lượng polyme/ARN khác có thể được điều chế bằng phương pháp tự kết hợp trong khi giữ lượng ss hoặc dsARN không đổi (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tóm lại, chitosan hoặc dẫn xuất của nó được hòa tan đến nồng độ mong muốn (ví dụ, 4%) trong dung dịch đệm có tính axit nhẹ (ví dụ, dung dịch đệm natri axetat 0,2M (pH 4,6)). Các dung dịch hoạt động có các nồng độ khác nhau (ví dụ, 0,01%-0,1%) được tạo ra từ nguyên liệu bằng cách hòa tan với cùng một đệm, và sau đó có thể được trộn đồng thời khuấy mạnh với thể tích bằng nhau của dung dịch ss hoặc dsARN (ví dụ, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trong đệm natri axetat 0,2M). Liên kết của ARN với chitosan được khử axetyl hóa một phần có thể bị ảnh hưởng sau khi ủ trong khoảng 1 giờ. Các hạt nano được kết hợp sau đó có thể được sử dụng mà không cần tinh chế thêm.

Theo một số khía cạnh của một số phương án, ít nhất một ARN bao gồm ít nhất một trình tự có thể liên kết thông qua cặp bazơ bổ sung, hoặc ít nhất 90% tương đồng với phân tử mARN đích của virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi. Theo phương án khác, ít nhất một dsARN bao gồm ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần hoặc ít nhất 90% tương đồng với phân tử mARN đích của virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi” hoặc “virus gây bệnh” đề cập đến chất virus chứa axit nucleic có thể tăng sinh trong động vật giáp xác được nuôi, virus gây bệnh trong động vật giáp xác, bằng cách phá vỡ chức năng thông thường và/hoặc sự sinh trưởng của cơ thể, và sử dụng các tế bào của động vật giáp xác, chất dinh dưỡng, chất chuyển hóa và/hoặc sự chuyển hóa năng lượng để sản sinh virus. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “virus” đề cập đến một nhóm lớn của tác nhân lây nhiễm siêu hiển vi bất kỳ được gọi là các vi sinh vật cực kỳ đơn giản hoặc phân tử cực kỳ phức tạp, thường chứa vỏ protein bao xung quanh lõi ARN hoặc ADN của vật liệu di truyền nhưng không có màng thấm, có thể phát triển và nhân lên chỉ trong tế bào sống, và gây ra các bệnh nghiêm trọng khác nhau ở người, động vật bậc thấp hơn hoặc thực vật. Do vậy, “virus gây bệnh cho động vật giáp xác được nuôi” có thể là một hoặc nhiều virus bất kỳ phá vỡ chức năng bình thường hoặc sinh trưởng của động vật giáp xác. Danh sách các virus nuôi trồng thủy sản chi tiết, cơ thể vật chủ của nó và bệnh liên quan là có sẵn tại website “The Fish

Site” và từ Bộ nông nghiệp Hoa Kỳ (xem bảng I).

Thuật ngữ “động vật giáp xác được nuôi” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến động vật giáp xác sống thủy sinh hoàn toàn hoặc một phần (tức là, sống ít nhất một phần của chu kỳ sống cơ thể ở trong nước), và được con người nuôi trồng (nuôi), trong môi trường nuôi trồng thủy sản. Các môi trường nuôi trồng thủy sản có thể bao gồm các bể nhân tạo, ao nhân tạo, lồng, hồ chứa và các dạng khác theo sáng chế. Thuật ngữ “môi trường nuôi trồng thủy sản” như được sử dụng trong bản mô tả này đồng nghĩa với “hệ thống nuôi trồng thủy sản”. Phần sau đây mô tả các khía cạnh và các dạng khác của môi trường nuôi trồng thủy sản thích hợp sử dụng với chế phẩm và phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Một dạng môi trường nuôi trồng thủy sản là nuôi trồng hải sản, một nhánh của nghề nuôi trồng thủy sản nuôi các sinh vật biển trong đại dương mở, một phần đóng của đại dương, hoặc bể hoặc ao chứa nước biển. Các loài cá vây (ví dụ, cá bơn và cá tuyết mec-lang), động vật giáp xác biển (ví dụ, tôm sú, tôm, tôm hùm và cua) và động vật thân mềm biển (ví dụ, sò và bào ngư) có thể được nuôi trong nước biển. Nghề nuôi trồng thủy sản nước ngọt thích hợp cho các loài sống nước ngọt bao gồm cá (ví dụ, cá rô phi, cá hồ), động vật giáp xác (ví dụ, tôm hùm đất) và động vật thân mềm sống nước ngọt (ví dụ, con trai). Một số loài đặc biệt thích hợp cho việc nuôi trồng ở nước lợ (cá chép, cá trê).

Một số hệ thống nuôi trồng thủy sản sử dụng nước chảy, cung cấp nước oxy hóa và loại bỏ các sản phẩm thải. Các môi trường nuôi trồng thủy sản khác, mà không đề cập đến phần chu trình nước chảy có thể chấp nhận, trong khi các môi trường khác sử dụng các kỹ thuật khác nhau (phun, sục) để hòa tan khí cho nước đứng theo sáng chế. Một số hệ thống nuôi trồng thủy sản sử dụng các hệ thống xử lý nước như các hệ thống bổ sung (ví dụ, bổ sung sinh học), ví dụ, hệ thống tái tuần hoàn như được mô tả trong patent Mỹ số 8,506,881 của Bradley, và cộng sự.

Các môi trường nuôi trồng thủy sản có thể bao gồm các hệ thống ao mở, như là ao, bể, đập và hồ, mà bề mặt nước tiếp xúc với không khí mở, hoặc hệ thống ao đóng, trong đó ao được che phủ, cho phép kiểm soát ánh sáng, nhiệt độ và khí tốt hơn.

Một số hệ thống nuôi trồng thủy sản là hệ thống đơn canh-một động vật giáp xác được nuôi trong toàn bộ môi trường nuôi trồng thủy sản. Nuôi cấy đơn canh có các ưu

điểm (dễ dàng thu hoạch, cung cấp dinh dưỡng đơn giản), nhưng cũng có các nhược điểm, khi nuôi cấy một loài duy nhất không cho phép sự quay vòng chu trình dinh dưỡng. Mặt khác, nuôi trồng thủy sản đa năng tích hợp (IMTA) nuôi nhiều loài khác nhau cùng trong một môi trường nuôi trồng thủy sản, và do đó các nhu cầu dinh dưỡng của các loài thành phần có thể được kết hợp thành hệ thống duy nhất mà quay vòng dinh dưỡng (ví dụ, chất thải của cá và động vật giáp xác cung cấp dinh dưỡng cho động vật thân mềm và tảo biển, khi nuôi cùng nhau).

Theo một số phương án, động vật giáp xác được nuôi thích hợp để sử dụng với các phương pháp và các chế phẩm theo sáng chế là tôm, tôm sú và các loài tương tự sống thủy sinh. Theo một số phương án, động vật giáp xác được nuôi thích hợp sử dụng theo sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này được chọn từ nhóm bao gồm tôm, tôm sú, cua, tôm hùm và tôm hùm đất. Cụ thể, theo một số phương án, động vật giáp xác được nuôi là tôm và/hoặc tôm sú. Cụ thể, theo một số phương án, tôm và tôm sú được chọn từ nhóm bao gồm *Litopenaeus vannamei*, *Panaeus monodon*, *Penaeus japonicus* và *Macrobrachium rosenbergii*.

Bảng I ở trên bao gồm danh sách không bao gồm hết tất cả các tác nhân virus gây bệnh ví dụ của động vật giáp xác được nuôi mà gây ra hoặc tạo thuận lợi cho bệnh được chỉ ra ở động vật giáp xác vật chủ xác định, và tác động lên cơ thể vật chủ có thể nhạy điều trị hoặc phòng ngừa bởi các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế.

Theo đó, theo một phương án của sáng chế, sinh vật gây bệnh là virus, gây ra hoặc tạo thuận lợi cho bệnh virus ở động vật giáp xác được nuôi, như virus gây bệnh đốm trắng (WSSV, số truy cập AF332093), virus gây hội chứng Taura (TSV số truy cập NC_003005), virus đầu vàng (YHV, số truy cập FJ848673.1), virus liên quan đến mang (GHV, số truy cập NC_010306.1), virus gây bệnh hoại tử cơ quan tạo máu và cơ quan biểu mô (IHHNV, số truy cập NC_002190), virus gây bệnh hoại tử cơ (IMNV, số truy cập KR815474.1), *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (virus MrN số truy cập NC_005094.1(1) và NC-005095.1(2)) và virus gây bệnh hoại tử tuyến tụy (IPNV, số truy cập NC 001915.1(A) và NC 001916.1(B)).

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra mối quan hệ giữa các thành phần và thông số nhất định đặc trưng cho hạt nano chitosan-dsARN theo sáng chế, nhân tố chính trong hiệu quả của cả liên kết và phân phối dsARN ở đích dự định bằng hạt nano chitosan-

dsARN. Tỉ lệ khối lượng của hạt nano (khối lượng của chitosan so với khối lượng của dsARN trong hạt nano) khác với mức độ khử axetyl hóa của chitosan được sử dụng. Sự tăng lên trong tỉ lệ khối lượng dẫn đến sự tăng lên trong kích thước hạt nano (xem ví dụ 1 và FIG.4A dưới đây). Kích thước hạt nano có thể được đo theo nhiều cách khác nhau, bao gồm tán xạ ánh sáng động, kính hiển vi điện tử truyền qua, BET (vùng bề mặt cụ thể) và đường kính trung bình z hiệu quả.

Do đó, theo một số phương án, kích thước hạt của hạt nano nằm trong khoảng từ 50 đến 500nm, từ 65 đến 350nm, từ 75 đến 300nm, từ 80 đến 250nm, từ 100 đến 200nm, từ 120 đến 180nm, và từ 140 đến 160nm, như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả. Theo các phương án cụ thể, khoảng kích thước hạt nano theo sáng chế là từ 150 đến 250nm như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả. Theo các phương án khác, các hạt nano là từ 150 đến 250nm như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả. Theo các phương án khác nữa, các hạt nano là từ 200 đến 250nm như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả. Một số hạt nano theo sáng chế, kích thước hạt là từ 140 đến 180nm, hoặc từ 175 đến 250nm như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả. Các hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế là từ 100 đến 200nm như được đo bởi đường kính trung bình z hiệu quả.

Tuy nhiên, thông số hạt nano khác bị ảnh hưởng bởi mức độ khử axetyl hóa của chitosan và lượng ss hoặc dsARN được tải lên hạt nano, là điện tích bề mặt (điện thế z) của hạt nano ARN-chitosan, cũng quan trọng đối với sự hấp thụ thích hợp và phân phối của ARN tại đích.

Việc đo điện tích bề mặt của hạt nano có thể được thực hiện bởi nhiều phương pháp khác nhau, bao gồm tán xạ ánh sáng động (DLS) kết hợp với trường điện tử ứng dụng (điện di). Khi sử dụng thử nghiệm DLS-điện di, sự tính toán chính xác điện tích bề mặt của hạt nano phụ thuộc vào độ pH của trường trong quá trình thử nghiệm. Trong hạt nano, điện thế zeta là chỉ báo của lực đẩy hoặc lực hút điện tích tĩnh điện giữa các hạt, ảnh hưởng lên độ ổn định của các hạt trong dịch nổi (xu hướng kết hợp lại), và cũng như lượng tương tác của hạt nano có các màng tế bào tại đích và có vẻ là sự hấp thụ vào trong tế bào đích.

Các tác giả đã phát hiện ra rằng các hạt nano chitosan khử axetyl hóa một phần (ví dụ, khử axetyl hóa 55% và 42%) khác biệt ở chỗ điện tích dương và điện thế z thấp

hơn chitosan không được xử lý, khi được đo cùng giá trị mật độ khối lượng (xem thí nghiệm 1, và FIG.4B).

Do đó, theo một số phương án, điện tích bề mặt (điện thế z) của các hạt nano, được đo tại pH 4,6, nằm trong khoảng từ 5 đến 100mV, từ 10 đến 90mV, từ 15 đến 85mV, từ 15 đến 25mV, từ 20 đến 75mV, từ 30 đến 60mV, từ 40 đến 50mV và từ 45 đến 50mV. Theo các phương án cụ thể, điện tích bề mặt của hạt nano theo sáng chế nằm trong khoảng từ 15 đến 25mV, từ 15 đến 25mV, từ 12 đến 20mV và từ 12 đến 15mV.

Các biến đổi hóa học của chitosan đã được thực hiện để tăng cường hiệu quả chuyển nạp gen của nó. Chitosan phổ biến nhất có thể bị biến đổi cấu trúc với các phối tử kỵ nước, ưa nước, lưỡng phần, CPP và các phối tử đặc hiệu tế bào sử dụng nhóm amin phản ứng (vị trí C2) và các nhóm hydroxyl (vị trí C6 và C3).

Do vậy, các hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế cũng có thể được điều chế với các biến đổi hóa học (ngoài việc giảm mức độ khử axetyl hóa như được mô tả ở trên), ví dụ, để tăng hiệu quả liên kết và phân phối ss hoặc dsARN ở tế bào đích. Do đó, theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN còn bao gồm polyme. Danh sách không giới hạn của các polyme thích hợp để bổ trợ với hạt nano theo sáng chế bao gồm poly(lysine) (PLL), polyetylenimin mạch thẳng (l-PEI), polyetylenimin mạch nhánh (b-PEI), poly(etylen glycol) (PEG), Poly(amido amin) dạng cành G3 (PAMAM), poly(amino amin) mạch thẳng (PAA), poly(lactit-đồng-glycolit) (PLGA) và poly (beta-amino este) (PBAE).

Theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN như được mô tả trong bản mô tả này có thể còn bao gồm polyetylen glycol (PEG). Theo một phương án, trọng lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng được chọn từ nhóm bao gồm từ 1 đến 10 kiloDalton (kDa), từ 2 đến 8kDa, từ 1 đến 5kDa, và từ 2 đến 5kDa. Theo phương án cụ thể, trọng lượng phân tử của PEG nằm trong khoảng từ 2 đến 5kDa. Tuy nhiên, PEG có trọng lượng phân tử khác cũng có thể được sử dụng. Đã được đánh giá rằng các hợp chất PEG chứa tập hợp các phân tử PEG có khoảng trọng lượng phân tử và trọng lượng phân tử này được chỉ ra liên quan đến trọng lượng phân tử trung bình của hợp chất.

Trong khi không muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, sự liên kết với PEG có thể ngăn chặn hoặc làm giảm sự kết tụ hạt nano in-vivo và tăng tính ổn định của hạt nano.

Theo đó, quá trình PEGyl hóa của hạt nano theo sáng chế có thể tạo ra chế phẩm

cải thiện sự phân phối theo đường ăn thức ăn bằng cách ăn.

Do đó, phương pháp tạo hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế có thể còn bao gồm các bước trộn và ủ các hạt nano với polyetylen glycol (PEG). Do sự biến đổi đồng hóa trị với nhóm PEG cần các hợp chất PEG chứa các nhóm chức phản ứng hoặc có thể nhắm trúng đích tại một đầu, các hợp chất PEG được biến đổi (ví dụ, các hợp chất PEG phản ứng amin) có thể được sử dụng cho quá trình PEGyl hóa của chitosan-ARN như được mô tả trong bản mô tả này. Các hợp chất PEG được biến đổi thích hợp, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở PEG-NHS (PEG có este NHS tại một đầu), MS(PEG)_n hoặc m-PEG-NHS (metyl-PEG_n-NHS este), PEG NHS mạch nhánh và các hợp chất khác. Danh sách các hợp chất PEG cụ thể thích hợp sử dụng với các hạt nano theo sáng chế có sẵn thương mại, ví dụ, từ Creative PEGworks (Chapel Hill, NC).

Theo một phương án, để PEGyl hóa chitosan, chitosan hoặc chitosan được khử axetyl hóa một phần được hòa tan trong 3% axit axetic, khuấy mạnh, nghiền bằng sóng âm, và điều chỉnh pH (chitosan được khử axetyl hóa cao có thể được điều chỉnh đến độ pH axit nhẹ, ví dụ, pH 6,5, trong khi chitosan được khử axetyl hóa một phần có thể được điều chỉnh đến pH kiềm nhẹ hơn, ví dụ, pH 7,0). Quá trình PEGyl hóa bắt đầu bởi việc bổ sung PEG-NHS hoặc mPEG-NHS và ủ đồng thời khuấy trong 24 giờ, sau đó thẩm tách kháng ddH₂O, và làm khô lạnh để lưu trữ. Phản ứng PEGyl có thể tạo ra các hạt nano được PEGyl hóa có các mức độ PEGyl hóa khác nhau của phân tử chitosan. Theo một số phương án, mức độ PEGyl hóa của chitosan được PEGyl hóa của các hạt nano nằm trong khoảng từ 1 đến 60%, từ 5 đến 50%, từ 10 đến 40%, từ 15 đến 35%, từ 5 đến 40% và 20 đến 30% chitosan được PEGyl hóa của các hạt nano. Cần phải hiểu rằng mỗi khoảng riêng biệt của quá trình PEGyl hóa thể hiện một phương án riêng biệt.

Sự tạo ra các hạt nano chitosan-ARN được PEGyl hóa sau đó có thể được thực hiện như được mô tả cho các hạt nano không được PEGyl hóa. Theo phương án cụ thể, các hạt nano được PEGyl hóa bao gồm chitosan-ARN được PEGyl hóa có sự PEGyl hóa nằm trong khoảng từ 5 đến 40%.

Các hạt nano chitosan-ARN được PEGyl hóa được mô tả có thể còn đặc trưng bởi tỉ lệ polyme (chitosan được PEGyl hóa) với ARN - tỉ lệ polyme/ss hoặc dsARN. Theo một số phương án, tỉ lệ polyme (ví dụ, chitosan được PEGyl hóa)/ARN nằm trong khoảng từ 2:1 đến 15:1, từ 4:1 đến 12:1, từ 5:1 đến 10:1 và từ 6:1 đến 8:1. Theo phương

án cụ thể, tỉ lệ polyme/dsARN cho các hạt nano được điều chế từ chitosan được khử axetyl hóa cao không được xử lý là khoảng 8:1. Theo một số phương án, tỉ lệ polyme/ARN cho các hạt nano chitosan-ARN được khử axetyl hóa một phần như được mô tả trong bản mô tả này nằm trong khoảng từ 10:1 đến 100:1, từ 20:1 đến 85:1, từ 25:1 đến 70:1, từ 35:1 đến 60:1 và từ 40:1 đến 50:1. Cần phải hiểu rằng mỗi khoảng riêng biệt của tỉ lệ polyme/ARN thể hiện một phương án riêng biệt. Theo phương án cụ thể, tỉ lệ polyme/ARN cho các hạt nano được điều chế từ chitosan-ARN được khử axetyl hóa một phần là khoảng 50:1.

Khả năng các hạt nano duy trì tính nguyên trạng cấu trúc có tính quyết định đối với hiệu quả của chúng khi chất dẫn phân phối cho “trọng tải” ARN. Cần phải hiểu rằng việc tạo phức ARN vào trong hạt nano chitosan-ARN được khử axetyl hóa một phần tăng tính ổn định của axit nucleic, như được minh họa cho cả hạt nano chitosan-dsARN (xem ví dụ III) và hoặc hạt nano chitosan-ssARN theo sáng chế (xem ví dụ IV). Do đó, theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN là hạt nano ổn định.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hạt nano chitosan-ARN ổn định” được xác định là hạt nano duy trì một phần “trọng tải” ARN đáng kể, thậm chí trong các điều kiện khó khăn. Một phương pháp ổn định thích hợp là khả năng duy trì phần lớn “trọng tải” ARN ban đầu. Do đó, theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN là hạt nano ổn định, chứa ít nhất là 60% ARN của phức hợp khi tiếp xúc với môi trường chứa nước (nước biển, nước ngọt, nước lợ, v.v.). Theo các phương án khác, hạt nano chitosan-ARN chứa ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90% hoặc nhiều hơn ARN của phức hợp khi tiếp xúc với môi trường chứa nước hoặc môi trường. Theo các phương án cụ thể, hạt nano chitosan-ARN chứa ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90% hoặc nhiều hơn ARN của phức hợp khi tiếp xúc với môi trường chứa nước có pH nằm trong khoảng từ 4,2 đến 8,0. Theo một số phương án, pH của môi trường chứa nước hoặc môi trường nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,8, hoặc, cụ thể hơn là, pH 7,5.

Các hạt nano chitosan-dsARN như được bộc lộ có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở động vật giáp xác được nuôi. Các hạt nano hoặc chế phẩm được bộc lộ chứa các hạt nano có thể được cung cấp hoặc sử dụng cho động vật giáp xác được nuôi theo nhiều phương pháp sử dụng khác nhau, bao gồm, cho ăn, cho tiếp xúc với mô mang, thông qua mắt, thông qua da hoặc biểu bì (đặc biệt quan trọng trong

quá trình rụng lông) và thông qua vết thương bên ngoài (cắt hoặc trầy xước). Sử dụng chế phẩm ngoài đường tiêu hóa chứa các hạt nano như được bộc lộ cũng được bao hàm.

Theo các phương án cụ thể, các hạt nano chitosan-ARN được bộc lộ có thể được cung cấp (ví dụ, sử dụng) như là dược thực phẩm, bao gồm thức ăn cho động vật giáp xác được nuôi và các hạt nano chitosan-ARN như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, dược thực phẩm chứa hạt nano bao gồm ss hoặc dsARN có trình tự đơn, tức là, tất cả được định hướng đến trình tự ARN đích duy nhất. Theo các phương án khác, dược thực phẩm bao gồm các hạt nano chitosan-ARN chứa ss hoặc dsARN hướng đến nhiều hơn một trình tự mRNA đích, như được mô tả trong bản mô tả này. Trong tất cả, cần phải lưu ý rằng dược thực phẩm có thể chứa hạt nano chitosan-ARN, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng như được mô tả hoặc được đưa ra trong bản mô tả này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “dược thực phẩm” là sự kết hợp của “chế phẩm dinh dưỡng” và “chế phẩm dược dụng” và đề cập đến các chất có thể ăn mà có một hoặc nhiều hiệu quả ảnh hưởng lên cơ thể như động vật giáp xác được nuôi. Thuật ngữ “dược thực phẩm” cũng có thể đề cập đến một hoặc nhiều hợp chất có mặt trong chất có thể ăn. Các chất có thể ăn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chất bổ sung cho chế độ ăn, thức ăn hoặc dạng tương tự. Các thuật ngữ “dược thực phẩm” và “chất bổ sung dinh dưỡng” có thể được sử dụng để thay thế cho nhau. Hợp chất (ví dụ, sản phẩm thức ăn, sản phẩm dược thực phẩm hoặc dược dụng) có các tính chất dược lý, dinh dưỡng, sinh học hiệu quả đề cập đến khả năng của các chất tạo ra một hoặc nhiều hiệu quả về sức khỏe riêng lẻ như được mô tả trong bản mô tả này (ví dụ, sức đề kháng, khả năng phòng ngừa, giảm và/hoặc chữa trị một hoặc nhiều bệnh và/hoặc rối loạn như được mô tả trong bản mô tả này).

Dược thực phẩm có thể được sử dụng để điều trị bệnh hoặc cảm gen, và các ví dụ của động vật giáp xác được nuôi được điều trị và bệnh có thể được phòng ngừa hoặc chữa trị ở động vật giáp xác được điều trị được mô tả trong bản mô tả này. Tùy thuộc vào động vật giáp xác được nuôi được điều trị, chế phẩm có thể được sử dụng bằng cách cung cấp hạt nano chitosan-ARN với việc cho ăn của động vật giáp xác hoặc, trong trường hợp là tôm hoặc động vật giáp xác khác, bằng cách cung cấp chế phẩm trong nước trong đó có động vật sống. Cần phải hiểu rằng chitosan được dẫn xuất từ chitin mà cấu thành một phần chế độ ăn đáng kể của nhiều loài sống ở nước mặn hoặc nước ngọt.

Tuy nhiên, động vật giáp xác nước mặn đã biết là loài ăn thịt đồng loại, ăn các thành viên trong quần thể cũng như các quần thể không liên quan. Do đó, các hạt nano chitosan-ARN như được mô tả trong bản mô tả này có thể cũng có hiệu quả phân phối ss hoặc dsARN đến động vật giáp xác được nuôi mà không cần kết hợp với việc cho ăn, cung cấp trong nước của môi trường nuôi trồng thủy sản trong đó có sinh vật sống.

Được đánh giá rằng tác dụng trị liệu của thực phẩm dinh dưỡng, khi được cung cấp như thức ăn, hoặc cùng với thức ăn trong nước của đối tượng giáp xác, có thể phụ thuộc vào quá trình ăn của đối tượng giáp xác, nhưng có thể cũng là được cung cấp gián tiếp bằng cách tiếp xúc với mô của đối tượng giáp xác, ví dụ, tiếp xúc với mang, mắt hoặc bề mặt khác mà cho phép chuyển hạt nano được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ như toàn bộ hạt nano, hoặc thậm chí chỉ thành phần ss hoặc dsARN của hạt nano tới tế bào của đối tượng động vật giáp xác vật chủ.

Hạt nano có thể được đưa vào một động vật giáp xác, với phương tiện và/hoặc tá dược có thể chấp nhận về mặt sinh lý. Phương tiện hữu ích được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, và bao gồm, ví dụ, nước, nước làm đậm, muối, glyxin, axit hyaluronic và các chất tương tự. Dung dịch dạng nước kết quả có thể được đóng gói để sử dụng như là, hoặc làm đông khô, chế phẩm đông khô được bù nước trước khi dùng, như đã đề cập trên. Chế phẩm có thể bao gồm chất phụ trợ được dùng như được yêu cầu đạt đến xấp xỉ điều kiện sinh lý, như là điều chỉnh pH và chất đệm, chất điều chỉnh cường hóa, chất làm ướt và các chất tương tự, ví dụ, natri axetat, natri lactat, natri clorua, kali clorua, canxi clorua, sorbitan monolaurat, trietanolamin oleat và các chất tương tự. Theo một phương án của sáng chế, hạt nano được đóng gói sao cho chế phẩm kết quả là kháng nước nhưng giải phóng trong hệ thống tiêu hóa của vật chủ giáp xác. Theo một phương án khác, phân tử được kết hợp với chất kết dính mà hỗ trợ trong sự liên kết phân tử với thức ăn, mà đặc biệt hữu ích trong việc cung cấp qua đường miệng. Như chất kết dính kháng nước có thể là bất kỳ chất nào có tính chất này. Ví dụ bao gồm, mà không bị giới hạn bởi agarosa hoặc hợp chất đường khác, albumin, anginit hoặc bất kỳ chế phẩm tương tự.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp trong thức ăn. Thức ăn cho các loài thủy sinh được nuôi bao gồm dầu cá và protein cũng như protein thực vật, khoáng chất và vitamin mà đạt được các yêu cầu dinh dưỡng của loài cá hoặc động vật giáp xác và cũng có thể mang lại lợi ích sức khỏe cho con người (tiêu thụ các loài nuôi). Theo

truyền thống, chế độ dinh dưỡng cho cá chứa 30-50% bột và dầu cá. Thức ăn thích hợp cho việc cung cấp thức ăn cho cá, động vật giáp xác và động vật thân mềm nuôi có thể tương tự hoặc khác nhau ở chế phẩm. Ví dụ, cá có thể được cho ăn nhiều loại thực phẩm khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn bởi bột cá, bột hạt đậu hà lan, cám lúa mì, bột mì, máu, vitamin, gluten bắp và gluten lúa mì.

Động vật giáp xác có thể được cho ăn thực phẩm khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn bởi bánh dầu đậu nành, bột cá, dầu cá, bột mì, bột đậu tương, dầu mực, men bia, bột tôm, bột mực, cỏ linh lăng, gluten lúa mì, bột gan mực, nấm men, bột đầu tôm, bột vỏ tôm và các vitamin. Có thể được cung cấp dưới nhiều dạng, ví dụ như viên thức ăn.

Chế phẩm theo một số phương án của sáng chế có thể bao gồm thêm ít nhất tác nhân hoạt động bề mặt, phương tiện mang trợ, chất bảo quản, chất kích thích ăn, chất hấp dẫn, tác nhân tạo vỏ, chất kết dính, chất nhũ hóa, thuốc nhuộm, chất bảo vệ khỏi tác động tia cực tím, chất đệm, tác nhân tạo dòng hoặc thể cho hoạt chất dinh dưỡng vi lượng (ví dụ, vitamin), thuốc hoặc chế phẩm khác mà ảnh hưởng đến sức khỏe hoặc sự tăng trưởng, trạng thái tốt hoặc sức chịu bệnh/áp lực của động vật giáp xác được nuôi.

Hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế có thể được điều chế như hoạt chất dinh dưỡng cho động vật giáp xác được nuôi bằng cách trộn hạt nano với thức ăn của động vật giáp xác được nuôi. Hạt nano chitosan-ARN theo sáng chế có thể được trộn với thức ăn giáp xác nuôi theo những cách khác nhau, ví dụ, hạt có thể được bổ trợ với thức ăn nuôi tôm bằng cách trộn chế phẩm này với thức ăn đã có và làm khô bằng không khí, sau đó phun hỗn hợp với dầu cá hoặc gelatin. Theo một số phương án, hạt nano chitosan-ARN có thể được trộn với thức ăn theo chế phẩm (dạng lỏng) và sau đó phía trên thức ăn được phun với gelatin. Thức ăn có thể cũng được phun phía trên với cả gelatin và chế phẩm dạng lỏng của hạt nano chitosan-ARN. chế phẩm bột khô của hạt nano chitosan-ARN cũng có thể được sử dụng, ví dụ, bằng cách phun khô hạt nano chitosan-ARN, trộn hạt nano chitosan-ARN phun khô với thành phần thức ăn và phun phía trên với gelatin.

Theo một số phương án, hạt nano được trộn với thức ăn với tỷ lệ khoảng 10-10.000µg ss hoặc dsARN mỗi gam của thức ăn tôm và/hoặc tôm sú, 50-8.000µg ss hoặc dsARN mỗi gam của thức ăn tôm và/hoặc tôm sú, 100-5.000µg ss hoặc dsARN mỗi gam

của thức ăn tôm và/hoặc tôm sú, 200-1.000 μ g ss hoặc dsARN mỗi gam của thức ăn tôm và/hoặc tôm sú, 250- 5.000 μ g ss hoặc dsARN mỗi gam của thức ăn tôm và/hoặc tôm sú và 500-5.000 μ g ss hoặc dsARN mỗi gam của thức ăn tôm và/hoặc tôm sú. Sẽ được đánh giá cao khi mỗi khoảng riêng biệt của tỷ lệ dsARN mỗi gam thức ăn thể hiện cho phương án riêng biệt, độc lập. Theo phương án cụ thể, hạt nano được trộn với thức ăn tại tỷ lệ 50-500 μ g ss hoặc dsARN mỗi gam thức ăn tôm và/hoặc tôm sú. Theo một số phương án, trong đó động vật giáp xác là tôm và/hoặc tôm sú, được thực phẩm được cung cấp ở liều lượng 3-10% trọng lượng cơ thể của tôm trên thức ăn hàng ngày. Theo một số phương án hạt nano hoặc được thực phẩm được cung cấp ở liều lượng 5% trọng lượng cơ thể của tôm trên mỗi lần cho ăn.

Tần suất cung cấp hạt nano hoặc được thực phẩm (chế độ) sẽ khác nhau đối với các loài thủy sản nuôi, và trong một số trường hợp, đối với giai đoạn cụ thể của chu kỳ sống của sinh vật nuôi. Như vậy, theo một số phương án, sinh vật nuôi là tôm và/hoặc tôm sú, và hạt nano hay hoạt chất dinh dưỡng theo sáng chế được cung cấp trong 1-10, 2-8, 3-6 hoặc 1-3 lần ăn mỗi chu kỳ sống của tôm và/hoặc tôm sú. Theo một phương án cụ thể, sinh vật nuôi là tôm và/hoặc tôm sú, và hạt nano hay hoạt chất dinh dưỡng theo sáng chế được cung cấp trong 1-3 lần ăn mỗi chu kỳ sống của tôm và/hoặc tôm sú. Theo một phương án khác, mỗi lần cho ăn là ít nhất một lần, hai lần, ít nhất ba lần, ít nhất bốn, năm hoặc nhiều lần hơn mỗi ngày, và từng giai đoạn cho ăn kéo dài thêm ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, năm hay nhiều ngày hơn. Theo một số phương án cụ thể, mỗi lần cho ăn là ít nhất ba lần mỗi ngày. Theo một phương án khác, mỗi giai đoạn cho ăn được kéo dài thêm ít nhất năm ngày.

Sáng chế vì thế đề xuất phương pháp xử lý hoặc phòng ngừa bệnh hoặc sự làm câm gen bằng việc cung cấp cho động vật giáp xác được nuôi chế phẩm hoặc được thực phẩm theo sáng chế. chế phẩm có thể được cung cấp bằng bất kỳ phương thức nào được mô tả trên. Hạt nano theo sáng chế cũng hữu ích trong sản xuất chế phẩm điều trị bệnh do virus hoặc để làm câm gen virus, như được mô tả trong bản mô tả này. Một danh sách không hạn chế các bệnh hoặc tình trạng do virus ở động vật giáp xác được nuôi phù hợp để xử lý với chế phẩm và phương pháp của sáng chế, và virus gây bệnh kết hợp với chúng được cung cấp trong bản mô tả này (xem Bảng 1).

Theo một số phương án, ăn các hạt nano hay được thực phẩm theo sáng chế bởi giáp xác nuôi dẫn đến giảm mức độ của ít nhất một sản phẩm gen của virus gây bệnh ở

động vật giáp xác được nuôi, so với mức của sản phẩm gen virus gây bệnh trong ít nhất một trong những động vật giáp xác được nuôi cùng ăn không có ss hoặc dsARN nhắm đến sản phẩm gen của virus gây bệnh. Theo phương án khác, ăn các hạt nano hay được thực phẩm theo sáng chế bởi giáp xác nuôi dẫn đến giảm mức độ virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi, so với mức virus gây bệnh trong ít nhất một trong những động vật giáp xác được nuôi cùng ăn không có ss hoặc dsARN nhắm đến sản phẩm gen của virus gây bệnh.

Với các hạt nano và chế phẩm theo sáng chế này, có thể đạt được sự bảo vệ chống lại bệnh do virus trong động vật giáp xác được nuôi trong thời gian dài. Thời gian bảo vệ sau khi ít nhất một lần cho ăn với hạt nano hoặc virus gây bệnh nhắm đến được thực phẩm đã đạt được và bảo vệ ít nhất hai tuần, ít nhất là 20 ngày, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 ngày trở lên, có thể đạt được bằng cách sử dụng sáng chế này. Sẽ được đánh giá cao khi mỗi thời gian riêng biệt thể hiện cho phương án riêng biệt, độc lập.

Theo một số phương án, ăn bằng, hoặc tiếp xúc với động vật giáp xác được nuôi, hạt nano hoặc hoạt chất dinh dưỡng dẫn đến tăng khả năng sống sót, năng suất, tỷ lệ tăng trưởng, sức sống, sinh khối, chuyển hóa thức ăn, kích thước, chất lượng hương vị và mùi hoặc khoảng chịu áp lực của động vật giáp xác được nuôi đã đề cập, so sánh với động vật giáp xác được nuôi ăn thức ăn không có ss hoặc dsARN nhắm đến sản phẩm gen của virus gây bệnh đã đề cập.

Các tác giả sáng chế đã cho thấy rằng việc cung cấp hạt nano chitosan-ssARN cũng như hạt nano chitosan-ssARN theo sáng chế, bao gồm các trình tự ARN được nhắm trúng đích đến trình tự virus WSSV, có tác dụng trong bảo vệ tôm chống lại bị lây nhiễm và bệnh lý gây ra bởi sự lây nhiễm WSSV gây chết. Vì vậy, theo một số phương án, ăn bằng, hoặc tiếp xúc với động vật giáp xác được nuôi, hạt nano chitosan-ARN hoặc hoạt chất dinh dưỡng theo sáng chế dẫn đến tăng khả năng sống sót của động vật giáp xác được nuôi đã đề cập, so sánh với động vật giáp xác được nuôi ăn thức ăn không có ss hoặc dsARN nhắm đến sản phẩm gen của virus gây bệnh đã đề cập. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "khả năng sống sót" được định nghĩa là duy trì khả năng tồn tại. Thiếu "khả năng sống sót" được biểu thị là bị chết.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh lý do virus” hoặc “sự lây nhiễm virus gây bệnh” được định nghĩa là những thay đổi không mong muốn trong sinh lý học, hình thái học, khả năng sinh sản, giá trị kinh tế, sức sống, sinh khối, chất lượng hương vị, mùi, khoảng chống chịu áp lực của động vật giáp xác được nuôi, trực tiếp hoặc gián tiếp dẫn đến kết quả từ việc tiếp xúc với virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi. Theo một phương án của sáng chế, những thay đổi không mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn bởi sinh khối và/hoặc năng suất của động vật giáp xác bị bệnh hoặc nhiễm mầm bệnh. Theo một phương án khác của sáng chế, sự thay đổi trong năng suất bao gồm, nhưng không giới hạn thay đổi trong sản lượng mỗi lượng nuôi trồng thủy sản, thay đổi chất lượng của động vật giáp xác được nuôi, chất lượng hương vị và chất lượng mùi (ví dụ như của thịt) và những chất lượng tương tự. Theo một số phương án, vật chủ động vật giáp xác là tôm, tôm sú hoặc tôm đồng và virus gây bệnh là virus gây bệnh đốm trắng. Theo một số phương án, sự lây nhiễm WSSV gây ra bệnh đốm trắng ở vật chủ động vật giáp xác.

Triệu chứng lâm sàng của WSSV bao gồm việc giảm đột ngột trong sự tiêu thụ thực phẩm, thờ ơ, lớp cutin lỏng và thường rối loạn sắc tố màu đỏ, và sự hiện diện của các đốm trắng 0,5 đến 2,0mm trên bề mặt bên trong của giáp, phần phụ và lớp cutin trên đốt bụng. Thay đổi mô học được nhìn thấy trong biểu mô mang, tuyến râu, mô tạo máu, mô thân kinh, mô liên kết và mô biểu mô ruột. Tế bào bị lây nhiễm có phần nhô bên trong gây tắc mà bắt đầu gây vết tại bạch cầu ưa eosin, nhưng trở nên ưa kiềm so với tuổi; hạt nhân nở to với sự bám vào rìa chất nhiễm sắc; và làm sạch tế bào chất. Sự phát sinh bệnh liên quan đến hoại tử và phân hủy mô lan rộng.

Đốm trắng trên vỏ tôm bị lây nhiễm dưới kính hiển vi điện tử quét xuất hiện lớn, điểm hình vòm đo trên đường kính giáp từ 0,3 đến 3mm. Đốm trắng nhỏ hơn 0,02-0,1mm xuất hiện như các khối cầu liên kết trên bề mặt lớp cutin. Thành phần hóa học của các điểm tương tự trên giáp, canxi tạo ra 80-90% trên tất cả vật liệu và điều đó đưa ra giả thuyết là có nguồn gốc từ các bất thường của lớp biểu bì cutin.

Một số thay đổi sinh hóa đã được báo cáo sau khi lây nhiễm với virus này: tiêu thụ glucoza và nồng độ huyết tương lactate tăng, glucoza 6 phosphat dehydrogenaza hoạt động làm tăng và giảm nồng độ triglycerit. Hiệu điện thế phụ thuộc kênh anion của ti thể cũng được điều chỉnh lên.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “khả năng chống chịu áp lực” đề cập đến cả khả năng chịu áp lực sinh học, và khả năng chịu áp lực vô sinh. Cụm từ “áp lực vô sinh” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập tới bất kỳ ảnh hưởng xấu nào đến quá trình trao đổi chất, sinh trưởng, khả năng tồn tại và/hoặc khả năng sinh sản của vật chủ động vật giáp xác gây ra bởi tác nhân vô sinh. áp lực vô sinh có thể được gây ra bởi bất kỳ điều kiện sinh trưởng môi trường cận tối ưu như, ví dụ, nghèo oxy, nồng độ cao của chất độc, chất gây ô nhiễm hoặc chất thải trong nước, nhiệt độ nước thấp hoặc cao, độc tính kim loại nặng, nồng độ dinh dưỡng cao hay thấp (ví dụ thiếu hụt chất dinh dưỡng), nồng độ muối cao hay thấp (ví dụ độ mặn), ô nhiễm không khí, cường độ ánh sáng cao hay thấp (ví dụ không đủ ánh sáng) hoặc chiếu xạ tia cực tím. Áp lực vô sinh có thể là tác dụng ngắn hạn (ví dụ như tác dụng cấp tính, ví dụ như kéo dài khoảng một tuần) hoặc lựa chọn khác có thể là liên tục (ví dụ như tác dụng mãn tính, ví dụ như kéo dài ví dụ 10 ngày hoặc nhiều hơn). Sáng chế dự tính trạng thái mà trong đó có tình trạng áp lực vô sinh đơn hoặc trạng thái khác trong đó hai hoặc nhiều hơn áp lực vô sinh xuất hiện.

Như được sử dụng trong bản mô tả này cụm từ "khoảng chống chịu áp lực vô sinh" đề cập đến khả năng của giáp xác thủy sản nuôi phải chịu áp lực vô sinh mà không thể hiện tổn thương đáng kể về sinh lý hay vật lý (ví dụ như sự thay đổi trong sự trao đổi chất, tăng trưởng, khả năng tồn tại và/hoặc khả năng sinh sản của động vật giáp xác).

Theo một số phương án, ăn hoặc tiếp xúc với hạt nano hoặc hoạt chất dinh dưỡng theo sáng chế làm tăng tỷ lệ tăng trưởng và chuyển hóa thức ăn. Tỷ lệ tăng trưởng có thể được đo bằng sinh khối hoặc năng suất, và có thể được sử dụng để chuyển hóa thức ăn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ “chuyển hóa thức ăn” đề cập đến phép đo sản lượng động vật giáp xác được nuôi trên đơn vị chất dinh dưỡng được cung cấp. Tác dụng chuyển hóa thức ăn thường là kết quả của sự biến đổi trong ít nhất trong số quá trình hấp thu, lây lan, hấp thụ, tích lũy, chuyển vị trí (ở thực vật) và sử dụng chất dinh dưỡng hấp thụ bởi động vật giáp xác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ/cụm từ "sinh khối", sinh khối của loài thủy sản nuôi hay "sinh khối vật chủ động vật giáp xác" đề cập đến lượng (ví dụ như đo bằng gam của mô được làm khô bằng không khí) của mô là sản phẩm từ vật chủ trong mùa phát triển.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ/cụm từ "sức sống" dùng để chỉ lượng (ví dụ, tính theo trọng lượng) của mô là sản phẩm của động vật giáp xác thủy sản nuôi trong thời gian nhất định. Tăng sức sống thể xác định hay ảnh hưởng đến năng suất hoặc năng suất trên mỗi thời gian sinh trưởng hoặc vùng đang phát triển.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ/cụm từ "năng suất" đề cập đến lượng (thí dụ, như được xác định theo trọng lượng hoặc kích thước) hoặc lượng (ví dụ, số lượng) của mô hoặc cơ quan là sản phẩm trên mỗi cá thể động vật giáp xác được nuôi, quần thể động vật giáp xác được nuôi hoặc trên mỗi mùa phát triển. Tăng năng suất có thể ảnh hưởng đến lợi ích kinh tế có thể thu được từ nuôi thủy sản tại một số vùng đang phát triển và/hoặc thời gian phát triển.

Theo một phương án thì năng suất được đo bằng hàm lượng protein.

Theo một phương án khác thì năng suất được đo bằng hàm lượng dầu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này "áp lực hữu sinh" đề cập đến áp lực xuất hiện là kết quả của sự tổn thương gây cho động vật giáp xác được nuôi bởi sinh vật sống khác, chẳng hạn như vi khuẩn, virus, nấm, ký sinh trùng, côn trùng có lợi và có hại.

Theo một số phương án của sáng chế, ăn hoặc tiếp xúc với hoạt chất dinh dưỡng hoặc hạt nano theo sáng chế dẫn đến: cải thiện khả năng chịu áp lực vô sinh (ví dụ, khả năng chịu chất lượng nước kém, nhiệt độ, lạnh, chất dinh dưỡng không tối ưu hoặc độ muối) hoặc áp lực hữu sinh (ví dụ như, bị quấy rầy hoặc bị thương); thành phần chất chuyển hóa sơ cấp biến đổi (ví dụ, axit béo, dầu, dầu omega-3, axit amin, protein, đường hoặc cacbohydrat); thành phần chất chuyển hóa thứ cấp (ví dụ như, ancaloit, terpenoit, polyketit, peptit không có ribosom và chất chuyển hóa thứ cấp của hỗn hợp gốc sinh tổng hợp); nguyên tố chỉ thị biến đổi (ví dụ, sắt, kẽm), hoặc thành phần vitamin (ví dụ như, tocopherol); cải thiện năng suất (ví dụ năng suất được cải thiện trong điều kiện không có áp lực) hoặc cải thiện năng suất dưới tác động áp lực vô sinh hoặc hữu sinh; cải thiện khả năng sử dụng nitơ hoặc các chất dinh dưỡng khác; biến đổi tăng trưởng hoặc đặc điểm sinh sản; cải thiện kết quả thu hoạch, tích lũy hoặc chất lượng xử lý (ví dụ, cải thiện kết quả thu hoạch, tích lũy, hoặc chất lượng xử lý), cải thiện sự hấp dẫn đến người tiêu dùng; hoặc bất kỳ kết hợp nào của những đặc điểm này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ "cải thiện" hoặc "tăng" đề cập đến việc tăng ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 3%, ít nhất khoảng 4%, ít nhất khoảng

5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90% hoặc lớn hơn trong bất kỳ các thông số trên, so sánh với động vật giáp xác được nuôi cùng loại hoặc tương tự mắc cùng một mầm bệnh hoặc có cùng một bệnh, và không ăn hoặc tiếp xúc với hoạt chất dinh dưỡng hoặc hạt nano (ví dụ, động vật giáp xác thủy sản nuôi không tiếp xúc với hoặc ăn hoạt chất dinh dưỡng hoặc hạt nano) theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ "giảm" đề cập đến việc giảm ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 3%, ít nhất khoảng 4%, ít nhất khoảng 5%, ít nhất khoảng 10%, ít nhất khoảng 15%, ít nhất khoảng 20%, ít nhất khoảng 25%, ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 35%, ít nhất khoảng 40%, ít nhất khoảng 45%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90% hoặc lớn hơn ở bệnh hoặc triệu chứng bệnh như là đốm trắng, sự chết hoại và tương tự như vậy ở động vật giáp xác được nuôi, so sánh với động vật giáp xác không được xử lý cùng loại hoặc tương tự.

Trong cả một số, những thay đổi trong các tham số âm hay dương của động vật giáp xác được nuôi được xử lý được đo tại thời điểm 2-3 tuần sau khi xử lý, 3-4 tuần sau khi xử lý, 5-7 tuần sau khi xử lý, 1-2 tháng sau khi xử lý, 2-4 tháng sau khi xử lý, 4-6 tháng sau khi xử lý, 5-8 tháng sau khi xử lý và 5-12 tháng sau khi xử lý hoặc nhiều hơn.

Theo một số phương án của sáng chế, thông số sức khỏe/bệnh được theo dõi ở động vật giáp xác được điều trị theo cách uống hoặc tiếp xúc với hoạt chất dinh dưỡng hoặc hạt nano. Theo một số phương án, giám sát các thông số (biểu hiện gen và/hoặc khoảng chống chịu áp lực, tốc độ tăng trưởng, v.v.) có thể được sử dụng để xác định chế độ điều trị của động vật giáp xác, ví dụ như đưa vào bổ sung hoạt chất dinh dưỡng hoặc hạt nano theo sáng chế, mở rộng việc điều trị với phương thức điều trị khác (ví dụ, thuốc sát trùng, thuốc kháng sinh, loài bổ sung cho việc nuôi thủy sản nhiều loài, v.v.). Lựa chọn cây trồng để theo dõi trong vùng trồng của thực vật có thể là ngẫu nhiên hoặc có hệ thống (ví dụ, động vật giáp xác cảnh báo có thể được lựa chọn trước trước khi điều trị).

Cũng được đề xuất trong sáng chế là động vật giáp xác được nuôi bao gồm chế phẩm hạt nano hoặc hoạt chất dinh dưỡng được mô tả trong bản mô tả này. Bất kỳ động vật giáp xác được nuôi (ví dụ như tôm hoặc tôm sú) có thể bao gồm chế phẩm hạt nano hay hoạt chất dinh dưỡng, và cụ thể, bất kỳ một trong số các nhóm bao gồm tôm, tôm sú, cua, tôm hùm và tôm đồng. Theo một số phương án cụ thể thì động vật giáp xác được nuôi là tôm hoặc tôm sú. Tôm hoặc tôm sú phù hợp có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Litopanaeus vannamei*, *Panaeus monodon*, *Penaeus japonicas* và *Macrobrachium rosenbergii*.

Hơn nữa, theo một số phương án đó là cung cấp môi trường nuôi trồng thủy sản bao gồm động vật giáp xác được nuôi chứa được thực phẩm hoặc hạt nano được mô tả trong bản mô tả này. Môi trường nuôi trồng thủy sản có thể là ao, quây mùng hoặc bể chứa. Ao, bể chứa hoặc quây mùng có thể hơn nữa là môi trường nuôi trồng thủy sản hệ thống mở hoặc khép kín.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ "khoảng" đề cập đến $\pm 10\%$.

Các thuật ngữ “bao gồm”, “chứa”, “có” và kết hợp của chúng có nghĩa là “bao gồm nhưng không giới hạn ở”.

Thuật ngữ "gồm có" có nghĩa là "bao gồm và giới hạn bởi".

Thuật ngữ "cơ bản gồm có" có nghĩa là chế phẩm, phương pháp hoặc cấu trúc có thể bao gồm thành phần bổ sung, các bước và/hoặc bộ phận, nhưng chỉ khi các thành phần bổ sung, các bước và/hoặc các bộ phận không cụ thể làm thay đổi đặc tính cơ bản và mới của chế phẩm, phương pháp hoặc cấu trúc yêu cầu bảo hộ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, dạng số ít gồm cả dạng số nhiều trừ khi được chỉ rõ trong ngữ cảnh khác. Ví dụ, thuật ngữ "hợp chất" hay "ít nhất một hợp chất" có thể bao gồm phần lớn hợp chất, kể cả các hỗn hợp của chúng.

Trong đơn sáng chế này, phương án khác nhau theo sáng chế này có thể được trình bày trong định dạng chuỗi. Nên được hiểu rằng mô tả trong định dạng thống kê chỉ với mục đích tiện lợi và ngắn gọn và không nên hiểu là giới hạn phạm vi sáng chế. Theo đó, mô tả chuỗi cần được xem như là cụ thể bộc lộ tất cả các khoảng dưới có thể cũng như giá trị số riêng lẻ trong chuỗi đó. Ví dụ, mô tả của chuỗi ví dụ như 1-6 nên được xem như là có khoảng dưới bộc lộ cụ thể như 1-3, 1-4, 1-5, 2-4, 2-6, từ 3 đến 6 v.v.,

cũng như số riêng lẻ trong chuỗi đó, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5 và 6. Điều này áp dụng không phụ thuộc vào khoảng rộng của chuỗi này.

Bất cứ khi nào chuỗi số được chỉ định trong bản mô tả này, nó có nghĩa là để bao gồm bất kỳ số trích dẫn (phân số hoặc số nguyên) trong chuỗi chỉ định. Các cụm từ "khoảng/khoảng giữa" chỉ số thứ nhất và chỉ số thứ hai và "khoảng/khoảng từ" chỉ số thứ nhất "đến" chỉ số thứ hai được sử dụng trong bản mô tả này thay thế cho nhau và có nghĩa là để bao gồm chỉ số thứ nhất và thứ hai và tất cả phân số và số nguyên giữa chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này thuật ngữ "phương pháp" đề cập đến phương thức, phương tiện, kỹ thuật và các bước tiến hành cho việc hoàn thành một nhiệm vụ nhất định bao gồm nhưng không giới hạn, những phương thức, phương tiện, kỹ thuật và bước tiến hành đó được biết đến hoặc dễ dàng phát triển từ phương thức đã biết, có nghĩa là, kỹ thuật và các bước tiến hành bởi những chuyên viên trong lĩnh vực kỹ thuật về hóa học, dược lý, sinh học, sinh hóa và y tế.

Được hiểu rằng bất kỳ số chỉ định trình tự (SEQ ID NO) được bộc lộ trong ứng dụng sắp tới có thể đề cập đến hoặc là trình tự ADN hoặc trình tự ARN, phụ thuộc vào ngữ cảnh mà SEQ ID NO được đề cập, kể cả khi SEQ ID NO đó được biểu hiện chỉ ở dạng trình tự ADN hoặc dạng trình tự ARN. Ví dụ, SEQ ID NO: 47 (Rab7) được biểu hiện ở dạng trình tự ADN (ví dụ, đọc T đối với thymin), nhưng nó có thể đề cập tới hoặc là trình tự ADN tương ứng với trình tự axit nucleic Rab7, hoặc trình tự ARN của trình tự axit nucleic phân tử ARN. Tương tự như vậy, mặc dù một số trình tự được biểu hiện ở dạng trình tự ARN (ví dụ, đọc U đối với uraxin), tùy thuộc vào loại phân tử thực tế được mô tả, nó có thể đề cập đến hoặc trình tự của phân tử ARN gồm dsARN, hoặc trình tự của phân tử ADN tương ứng với trình tự ARN được thể hiện. Trong bất cứ trường hợp nào, cả hai phân tử ADN và ARN có trình tự được bộc lộ với các phân tử thể bất kỳ được hình dung.

Đánh giá rằng các dấu hiệu kỹ thuật nhất định của sáng chế, mà là, để rõ ràng, được mô tả trong ngữ cảnh các phương án riêng biệt, cũng có thể được đề xuất kết hợp với phương án riêng lẻ. Ngược lại, các dấu hiệu kỹ thuật khác nhau của sáng chế là, theo cách ngắn gọn, được mô tả trong ngữ cảnh của phương án riêng lẻ, cũng có thể được đề xuất một cách riêng biệt hoặc theo sự kết hợp phụ thích hợp bất kỳ hoặc thích hợp với

bất kỳ phương án được mô tả khác theo sáng chế. Các dấu hiệu kỹ thuật nhất định được mô tả trong ngữ cảnh của nhiều phương án khác nhau không được coi như là các dấu hiệu kỹ thuật chủ yếu của những phương án đó, trừ khi phương án này không có hiệu quả khi không có yếu tố đó.

Các phương án và các khía cạnh khác nhau của sáng chế như mô tả ở trên và như được yêu cầu bảo hộ trong đoạn yêu cầu bảo hộ phía dưới được hỗ trợ dựa trên thử nghiệm trong các ví dụ dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tài liệu tham khảo đang thực hiện cho các ví dụ sau đây, mà cùng với các mô tả ở trên minh họa một số phương án của sáng chế theo cách không giới hạn.

Nhìn chung, thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này và bước tiến hành phòng thử nghiệm được sử dụng trong sáng chế bao gồm kỹ thuật ADN phân tử, sinh hóa, vi sinh vật và tái tổ hợp. Những kỹ thuật này được giải thích xuyên suốt trong bản mô tả này. Xem, ví dụ, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook và cộng sự, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel và cộng sự, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley và Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson và cộng sự, “Recombinant ADN”, Scientific American Books, New York; Birren và cộng sự (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, các tập 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); phương pháp luận như được nêu trong các patent Mỹ số 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 và 5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Culture of Animal Cells – A Manual of Basic Technique” của Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), xuất bản lần thứ ba; “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites và cộng sự (eds), “Basic and Clinical Immunology” (xuất bản lần thứ 8), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell và Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman và Co., New York (1980); thử nghiệm miễn dịch đã có được mô tả thêm trong bằng độc quyền sáng chế và tài liệu khoa học, ví dụ, các patent Mỹ số 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219;

5,011,771 và 5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., và Higgins S. J., eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, B. D., và Higgins S. J., eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R. I., ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) và “Methods in Enzymology” Tập 1, 2, 317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak và cộng sự, “Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); tất cả đều được kết hợp bằng cách viện dẫn nếu như được nêu đầy đủ trong bản mô tả này. Các tài liệu tham khảo chung được đề xuất trong toàn bộ tài liệu này. Các bước tiến hành trong đó được cho là biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và được đề xuất thuận tiện cho người đọc. Tất cả các thông tin chứa trong đó được kết hợp trong tài liệu tham khảo.

Ví dụ I: hiệu quả phân phối qua đường miệng của dsARN bằng hạt nano chitosan được n-axetyl hóa.

Các chitosan với mức độ khử axetyl hóa khác nhau đã được tổng hợp bằng phản ứng N-axetyl hóa đồng nhất giữa anhydrit axetic và chitosan khử axetyl hóa mức cao. Sử dụng kết quả dẫn xuất chitosan, mức độ mà sự khử axetyl hóa chitosan ảnh hưởng sự tạo ra hạt chitosan-dsARN, giải phóng dsARN, và cuối cùng là làm câm gen in-vivo bằng cách phân phối qua đường miệng được đánh giá.

Vật liệu và phương pháp:

Tạo ra dsARN

Rab7-dsARN được tổng hợp bởi hệ thống vi khuẩn in vivo. Để nhân bản plasmit tái tổ hợp chứa đoạn lắp đảo ngược của thân và vòng lắp đoạn tổng hợp chứa protein liên quan đến Ras *Litopenaeus vannamei* (Rab7, số truy cập # JQ581679) từng phần trình tự và phần bổ sung không mã hóa cho vòng lắp (SEQ ID NO: 48, vòng lắp) được tổng hợp (SEQ ID NO: 46, đoạn Rab7 với vòng lắp).

Đoạn này được sử dụng như khuôn để khuếch đại trình tự 250bp Rab7 có nghĩa + vùng vòng lắp sử dụng các môi:

XbaI Rab7 môi xuôi GAAACTCTAGATGGGTAACAAGATTGATCTGGAG

(SEQ ID NO: 26) và BamHI Rab7 mỗi ngược AGCCGGATCCtagcttacga (SEQ ID NO: 27). Sản phẩm PCR được nhân bản thành pET9a (Novagen) sử dụng vị trí giới hạn XbaI + BamHI. Rab7 đối nghĩa được khuếch đại PCR sử dụng cùng một khuôn với mỗi sau đây: BamHI mỗi xuôi GCATAGGATCCTGGGTAACAAGATTGATCTGGAG (SEQ ID NO: 28) và PstI mỗi ngược GAGTACTGCAGCATCCTGTTTAGCCTTGTTGTCA (SEQ ID NO: 29) và được nhân bản bằng BamHI, PstI để tạo ra plasmit cuối cùng - iARN pET9a-Rab7 250. Plasmit tái tổ hợp (pET9a-Rab7 250) có chứa đoạn lặp đảo ngược của vòng lặp gốc Rab7 được biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt vào ribonucleaza III (RNaza III) E. coli đột biến mạch HT115. Sự biểu hiện của cấu trúc kẹp tóc Rab7 được gây ra bằng cách thêm Isopropyl- β -D Thiogalactoside (IPTG) 0.4mM vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Môi trường nuôi cấy được thu 4 giờ sau khi gây ra IPTG. ARN mạch đơn vi khuẩn (ssARN) và vùng vòng lặp của cấu trúc kẹp tóc Rab7 được thủy phân với ribonucleaza A (RNaza A). Sau đó, dsARN-GFP được chiết xuất bởi chất phản ứng phân tách ARN TRIzol® (ThermoFisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ mARN-Rab7 và dsARN-GFP được xác định bằng cách đo độ quang phổ UV tại bước sóng 260nm và điện di gel agarosa.

Phương pháp tương tự cũng được sử dụng để nhân bản các trình tự Rab7-ARNi ở 125bp và 70bp. Mỗi xuất hiện trong bảng dưới đây:

Bảng 3: Trình tự mỗi để nhân bản Rab7-ARNi

Tên mỗi	Trình tự	Chiều dài trình tự iARN	SEQ ID NO:
XbaI mỗi xuôi Rab7 70	GATCTCTAGAGAGGTGGAGCTGTACAATGAG	0	30
PstI mỗi xuôi vòng lặp	CGTCTGCAGCGCATCTTGC	0	31
BamHI mỗi xuôi Rab7 70	GATCGGATCCGAGGTGGAGCTGTACAATGAG	0	32
PstI Rab7 mỗi ngược	GACTACTGCAGCATCCTGTTTAGCCTTGTTGTC	0	33

BamHI Rab7 125	GAATCGGATCCTAATGTGGAGCTAGCTTTCCAG	25	34
PstI rab7s mỗi ngược	GAGTACTGCAGCATCCTGTTTAGCCTTGTTGTCA	25	35
PstI vòng lặp mỗi ngược	tacgtCTGCAGCGCATCTTG	25	36
XbaI rab7 125 mỗi xuôi	GAATCTCTAGATAATGTGGAGCTAGCTTTCCAG	25	37

N-axetyl hóa của chitosan

1,5g chitosan (HMC⁺ Chitoscience Chitosan 80/20, Mw 40-150kDa) được hòa tan trong 4% dung dịch axit axetic (50ml), và anhydrit axetic trong 50ml etanol nguyên chất được thêm vào. Là lượng anhydride acetic xác định mức độ phản ứng N-axetyl hóa và do đó xác định mức độ khử axetyl hóa (DD) của sản phẩm cuối cùng, lượng khác nhau của anhydride acetic được sử dụng. Sau khi khuấy ở 40°C trong 12 giờ, phản ứng đã được ngừng lại bởi sự trung hòa độ pH với NaOH (5M) đến pH 9. Kết tủa thu được được ly tâm (15.000g trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C) và rửa kỹ bằng nước khử ion ở pH 9. Bước tiến hành này được lặp lại 3 lần. Sau đó, kết tủa được rửa sạch từ dung môi và tạp chất bằng sự thẩm tách (SpectrumLabs, kích thước lỗ 12-14kDa) trong 5L nước khử ion trong 72 giờ. Nước được thay thế 8 lần trong giai đoạn này. Kết quả chitosan N-axetyl hóa được thu hồi từ các túi thẩm tách bằng cách sử dụng quy ly tâm (15.000g trong 15 phút ở 4°C) và làm đông khô trong 48 giờ bằng cách sử dụng chất làm khô lạnh (Labconco).

Xác định điện thế của mức độ khử axetyl hóa.

Chuẩn độ điện thế được sử dụng để xác định mức độ khử axetyl hóa (DD) của chitosan N-axetyl hóa. Nói một cách ngắn gọn, 0,2g chitosan tổng hợp hòa tan vào trong 30ml axit clohidric 0,1M. Sau 2 giờ khuấy liên tục, 25ml nước khử ion đã được thêm vào và khuấy tiếp tục thêm 1 giờ. Khi chitosan được hòa tan hoàn toàn, dung dịch được chuẩn độ với dung dịch natri hydroxit 0,1M. Từ việc chuẩn độ dung dịch này, đường cong với hai điểm uốn cong thu được. Lượng axit được dùng giữa hai điểm này được coi là tương ứng với lượng nhóm amino tự do trong dung dịch (Tolaimate, 2000).

Việc chuẩn độ được thực hiện với bộ đo pH (dụng cụ EUTECH).

Mức độ khử axetyl hóa (DD) của chitosan đã được tính toán bằng cách sử dụng chế phẩm:

$$\%DD = 2,03 \left[\frac{V2 - V1}{m + 0,0042(V2 - V1)} \right]$$

trong đó m là khối lượng của mẫu. V1, V2 là thể tích dung dịch natri hydroxit 0,1M tương ứng với điểm uốn. 2,03 là kết quả hệ số từ trọng lượng phân tử của đơn vị chitin monome. 0,0042 là kết quả hệ số từ sự khác nhau giữa trọng lượng phân tử của đơn vị chitin và chitin monome.

Điều chế hạt nano chitosan-dsARN

Chế phẩm với tỷ lệ khối lượng polyme/dsARN khác nhau đã được điều chế bằng phương pháp tự lắp ráp trong khi vẫn giữ lượng dsARN không đổi (20 µg/mL). Chitosan hoặc dẫn xuất N-axetyl hóa của nó được hòa tan tới nồng độ 4% trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M (pH 4,6). Dung dịch hoạt động với nồng độ 0,01%-0,1% đã được làm từ phần trữ lượng bằng cách pha loãng với cùng một dung dịch đệm. Thể tích tương đương của dung dịch dsARN Rab7 (100 µg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M) và dung dịch chitosan được trộn nhanh chóng dưới độ lắc cao trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại RT. Hạt nano được lắp ráp đã được sử dụng mà không cần tiếp tục làm sạch. Vì nồng độ dsARN vẫn không đổi đối với tất cả dung dịch hạt nano, thao tác với nồng độ chitosan thay đổi tỷ lệ khối lượng polyme/dsARN.

Đặc tính của hạt nano

Kích thước và điện tích bề mặt hạt (điện thế zeta) của hạt nano chitosan/dsARN được xác định bằng cách sử dụng Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, UK). Việc đo kích thước hạt được thực hiện tại góc 173° và nhiệt độ 25°C. Kích thước được biểu hiện dưới dạng đường kính thủy động lực học trung bình z thu được bằng phân tích lũy kế của dấu hiệu tuồn quan sử dụng độ nhớt và chỉ số khúc xạ của nước trong tính toán. Điện tích bề mặt của hạt nano được phân bố trong dung dịch đệm natri axetat (pH 4,6 trừ khi giá trị khác được chỉ định) được đo sử dụng tế bào mao dẫn lần có sẵn (Malvern Instruments, UK).

Lưu giữ và giải phóng dsARN

Sau khi tạo ra hạt nano, việc lưu giữ dsARN được đánh giá bằng cách điện di gel trong 1,5% agarosa (Sigma) trong TAE (X1, Hy-Labs) với ethidi bromua (Hy-Labs). Gel được chạy ở 100mV trong 30 phút và lưu giữ dsARN được nhìn thấy dưới tia UV.

Điều chế thức ăn cho tôm

1,5g thức ăn bao gồm 300µg dsARN được điều chế cho mỗi hệ thống hạt nano (phức hợp của chitosan hoặc dẫn xuất chitosan với dsARN 250bp Rab7). Nói một cách ngắn gọn, phương pháp xử lý hạt nano khác nhau đã được chuẩn bị bằng cách thêm 300µg 250bp Rab7 trong dung dịch đệm natri axetat 3,75mL (0,2M, pH 4,6) vào 3,75mL của dung dịch Cs, H35, H42 hoặc H55 (được điều chế trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M, pH4,6), thu được tỉ lệ khối lượng polyme/Rab7 là 50, 40, 30 và 8, tương ứng. Sau đó, dung dịch kết quả được lắc trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại RT. Sau khi làm khô lạnh qua đêm, phức hợp đông khô được hòa tan trong 1ml nước được xử lý DEPC (công nghiệp sinh học) và dung dịch kết quả được trộn kỹ lưỡng với 1,5g thức ăn hạt cho tôm thương mại. Khi bột viên đã ngâm hoàn toàn với dung dịch hạt nano, chúng được sấy khô ở 60°C trong lò khí nóng cho 0,5 giờ.

Phân phối qua đường miệng của 250bp Rab7 ở tôm sử dụng hạt nano chitosan được axetyl hóa.

Tôm *Peneaus vanameii* 6 tuần tuổi được phân chia vào sáu nhóm (12 con tôm mỗi nhóm), mà được giữ riêng biệt với nhau để thử nghiệm cảm gen. Trong nhóm I, tôm được cho ăn với thức ăn hạt thương mại. Trong nhóm II, tôm được cho ăn với hạt được điều chế với dsARN tự do (200µg mỗi g thức ăn). Trong nhóm III, IV, V và VI, tôm được cho ăn với viên chứa phức hợp trên cơ sở H35, H42, H55 và chitosan, một cách tương ứng, tất cả bao gồm 200µg dsARN mỗi gam thức ăn. 5 ngày sau khi bắt đầu thử nghiệm (2 lần cho ăn mỗi ngày, cho ăn hàng ngày tương ứng với 5% trọng lượng cơ thể) tôm bị cắt ra và phân mang từ mỗi con tôm đã được thu thập và được cho ngay lập tức vào trong nitor lỏng cho đến khi sử dụng.

Thu thập mẫu, tách chiết ARN và tổng hợp cADN

Mẫu mang từ mỗi con tôm được cho ngay lập tức vào trong nitor lỏng cho đến khi sử dụng. Các mẫu được làm đồng nhất sử dụng giọt thủy tinh trong 1ml chất phân ứng TRIzol® tinh khiết bằng cách sử dụng một máy trộn mô tơ chày Argos và tất cả ARN được chiết xuất bằng thuốc thử phân tách ARN TRIzol® (ThermoFisher

Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó xử lý ADNza (TURBO ADN-free™ Kit, Ambion). cADN sợi thứ nhất được tổng hợp bằng cách sử dụng RevertAid First Strand cADN Synthesis theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

PCR thời gian thực

Định lượng của gen Rab7 (số truy cập #FJ811529) bằng phương pháp định lượng PCR được thực hiện như mô tả bằng (Vatanavicharn và cộng sự, 2014). Trình tự mỗi đầu phân tích qRT đã được lựa chọn từ đoạn Rab7 mà không phải là một phần của đoạn lựa chọn để tạo ra dsARN để tránh các lỗi gây ra bởi việc phân phối dsARN. 2µl của cADN được sử dụng trong phản ứng 10µl điều chế sử dụng đầu dò qPCRBIO Mix Lo-ROX (PCR Biosystems) và thử nghiệm qPCR PrimeTime® (IDT) có chứa các đoạn mỗi và đầu dò sau: Rab7 mỗi xuôi GGGATACAGCTGGTCAAGAAA (SEQ ID NO: 38); Rab7 mỗi ngược CGAGAGACTTGAAGGTATTGGG (SEQ ID NO: 39) và đầu dò được gắn nhãn FAM – CGAGGAGCTGATTGTTGTGTTCTCGT (SEQ ID NO: 40) (đoạn mỗi 500nM và đầu dò 250nM).

PCR được thực hiện trong hệ thống phát hiện PCR thời gian thực CFX96 Touch™ sử dụng điều kiện chu kỳ nhiệt mặc định. Giá trị Ct RT-PCR thời gian thực thu được cho Rab7 mARN được chuẩn hóa ngược với giá trị Ct thu được cho EF1α mARN (số truy cập #GU136229) sử dụng đoạn mỗi và đầu dò sau đây: EF1α mỗi xuôi GTGGAGACCTTCCAACAGTATG (SEQ ID NO: 41), EF1α mỗi ngược CCTTCTTGTTGACCTCCTTGAT (SEQ ID NO: 42) và đầu dò được gắn nhãn FAM TGCCTGACATGAAGCAGACGG (SEQ ID NO: 43). Giá trị Ct delta trung bình ± SD được xác định cho mỗi lần xử lý (tối thiểu 5 con tôm mỗi lần) và quá trình định lượng liên quan đến đối chứng không được xử lý thiết lập về 1.

Kết quả

Các chitosan với mức độ khử axetyl hóa khác nhau đã được tổng hợp bởi phản ứng N-axetyl hóa đồng nhất giữa anhydrit axetic và chitosan khử axetyl hóa mức cao. Sự khác nhau khi lượng 100% axetic anhydrit được thêm vào dung dịch phản ứng dễ dàng điều khiển mức độ khử axetyl hóa chitosan kết quả, như được thể hiện trong bảng 2 và FIG.2.

Bảng 2: Mức độ khử axetyl hóa của dẫn xuất chitosan dưới dạng chức năng của nồng độ anhydrit axetic

Mẫu	Anhydrit axetic được thêm vào (μ l)	Mức độ khử axetyl hóa
Cs	-	82,4
H75	90	75,5
H70	134	70,4
H66	246	66,2
H55	319	54,9
H42	468	41,6
H35	563	35,1

Các chitosan khác nhau, bao gồm cả chitosan thương mại có sẵn và dẫn xuất chitosan được khử axetyl hóa một phần được so sánh khả năng của chúng để phân phối dsARN và điều hòa thêm sự cảm gen. Trước tiên, hạt nano đã được điều chế bởi việc tự lắp ráp của chitosan và 250bp Rab7 dsARN. Bằng cách thay đổi nồng độ của polyme và giữ nồng độ dsARN không đổi, tỷ lệ khối lượng hạt polyme/Rab7 là khác nhau. Việc tự lắp ráp dsARN và chitosan là phụ thuộc vào mức độ khử axetyl hóa của dẫn xuất chitosan. Vì vậy, khi mức độ khử axetyl hóa giảm (ví dụ bằng cách phản ứng với anhydrit axetic), khả năng liên kết dsARN giảm, ví dụ nhiều chitosan hơn là cần thiết để hoàn toàn liên kết với cùng một lượng dsARN. Các hình vẽ từ FIG.3A đến FIG.3C biểu thị ảnh hưởng của mức độ khử axetyl hóa của chitosan đến hiệu suất liên kết dsARN đối với chitosan không được xử lý và dẫn xuất H42 và H55. Rõ ràng hơn là chitosan được khử axetyl hóa liên kết với dsARN hiệu quả hơn (ví dụ, liên kết hoàn toàn dsARN ở tỷ lệ khối lượng polyme/dsARN thấp hơn). Lưu ý rằng tỷ lệ khối lượng polyme/Rab7 để liên kết hoàn toàn dsARN đã tăng từ 2 đối với chitosan không được xử lý (FIG.3A, dòng 4) tới 25 đối với H42 (FIG.3C, dòng 11) khi mức độ khử axetyl hóa bị giảm từ 82,4% (chitosan không được xử lý) tới 42% (H42).

Ảnh hưởng của mức độ khử axetyl hóa lên tính chất vật lý của hạt chitosan

Tính chất vật lý ảnh hưởng đến tương tác tế bào và hấp thụ nội bào của hạt nano (ví dụ kích thước và điện tích bề mặt) đã được xác định. Thiết bị đo giá trị trung bình z hiệu quả đo được, mà được xác định kích thước trung bình để phân tích lũy tích, và điện thế zeta (điện tích) của phức hợp được xếp đặt ngược lại với tỷ lệ khối lượng polyme/Rab7 của hạt nano và được thể hiện trong FIG.4A và FIG.4B, tương ứng. Tất cả chế phẩm hạt nano (ví dụ được điều chế từ dẫn xuất chitosan khác nhau) cho thấy

kích thước hạt tăng khi tỷ lệ khối lượng tăng lên. Ví dụ, kích thước hạt của các chế phẩm H42/Rab7 với tỷ lệ khối lượng polyme/Rab7 khác nhau được trình bày trong FIG.4A. Đo điện tích bề mặt (FIG.4B) cho thấy lưới điện tích dương đối với tất cả hạt nano chitosan/dsARN được thể hiện. Dẫn xuất chitosan N-axetyl hóa (H55 và H42), đặc trưng bởi mức độ khử axetyl hóa thấp hơn, thể hiện giá trị điện thế zeta thấp so với chitosan không được xử lý, đối với tất cả tỷ lệ khối lượng đã kiểm tra. (FIG.4B). Ví dụ, điện thế zeta của hạt nano trên cơ sở H42 xấp xỉ là 15mV tại tỷ lệ khối lượng polyme/Rab7 là 40, trong khi hạt nano trên cơ sở chitosan (không được xử lý) biểu thị giá trị điện thế zeta 26mV.

Câm gen in vivo bằng cách cho ăn hạt nano chitosan-dsARN.

Để xác định xem phân phối dsARN qua đường ăn của hạt nano trên cơ sở chitosan N-axetyl hóa một phần có thể kích hoạt ARNi và làm câm gen in vivo, 12 con tôm *Penaeus vannamei* trưởng thành (150mg) được cho ăn với 45mg hạt nano tạo phức chitosan-dsARN (các dẫn xuất H35, H42, H55 hoặc các phức hợp trên cơ sở chitosan không được xử lý, bao gồm 200 μ g dsARN mỗi gam thức ăn), hoặc chế độ ăn Rab7(200 μ g Rab7 dsARN tự do mỗi gam thức ăn) hoặc thức ăn thương mại (thức ăn chăn nuôi đơn giản) hai lần mỗi ngày trong 5 ngày ở tổng liều hàng ngày là 5% sinh khối. 48 giờ sau lần ăn cuối cùng, tất cả tôm làm chết và tổng ARN được chiết xuất từ các mô tôm để phân tích định lượng PCR thời gian thực. Ảnh hưởng trên biểu hiện Rab7 mRNA tương đối ở tôm được trình bày trong FIG.5. Giảm xấp xỉ 2 lần trong biểu hiện Rab7 được quan sát thấy ở tôm mà tiêu hóa phức hợp hạt nano H42/Rab7 (biểu hiện gen 52%) và hạt nano H55/Rab7 (biểu hiện gen 61%), so sánh với tôm đối chứng được cho ăn dsARN tự do. Kết quả này chỉ ra rằng Rab7 dsARN, khi được tạo phức hợp với các dẫn xuất chitosan có mức độ khử axetyl hóa thấp hơn, như H42 hoặc H55 và hợp nhất trong chế độ ăn chế phẩm tiếp đó đi vào tế bào vật chủ (ví dụ, tôm) và có thể kích hoạt ARNi, cuối cùng ức chế biểu hiện Rab7 mRNA vật chủ.

Ví dụ II: Tác dụng phân phối qua đường miệng của dsARN được PEGyl hóa hạt nano chitosan n-axetyl hóa một phần.

Trong nỗ lực để tiếp tục cải thiện các tính chất bề mặt của chất mang nano chitosan, sự tương tác của chúng với môi trường đường tiêu hóa của tôm và cải thiện dsARN chuyển giao qua niêm mạc polyme, polyetylen glycol (PEG) đã được thêm vào

mạch chính hạt nano chitosan. PEG-NHS được kết hợp với chitosan và nhóm đầu amin H55 để tạo ra polyme PEG-Cs và PEG-H55, tương ứng, và ảnh hưởng của sự kết hợp PEG trên sự tạo ra hạt chitosan/H55-dsARN, sự ổn định của hạt nano tổng hợp và kết quả cảm gen sau khi phân phối qua đường miệng của các hạt được đánh giá.

Vật liệu và phương pháp

Tổng hợp PEG-H55 và PEG-Chitosan

PEG2000-NHS (mPEG-SG, Mw 2000, Creative PEGWorks) được liên hợp với chitosan và nhóm đầu amin H55 để tạo ra polyme hitosan-PEG2000 và H55-PEG2000, tương ứng. Một cách ngắn gọn, chitosan (Cs) và dẫn xuất chitosan H-55 (100mg mỗi dẫn xuất) đã được hòa tan trong 20mL 3% axit axetic dưới điều kiện khuấy cường độ lớn trong 1 giờ. Sau đó, mẫu đã được siêu âm trong 2 phút tại cường độ 40%. Sau khi siêu âm, pH của mẫu được điều chỉnh về 6,5 (đối với Cs) và 7 (đối với H-55), sử dụng NaOH 1M. Hai mẫu 250mg MPEG-NHS mỗi mẫu được hòa tan trong 15mL ddH₂O và thêm ngay lập tức vào mẫu H-55 và Cs. Dung dịch kết quả đã được ủ trong 24 giờ tại RT dưới điều kiện khuấy từ tính. Hỗn hợp kết quả đã được thẩm tách với màng thẩm tách (SpectrumLabs, kích thước lỗ 12-14kDa) dựa vào nước cất trong 48 giờ, và dung dịch được làm đông khô sau đó.

Điều chế hạt nano chitosan-dsARN

Chế phẩm với thành phần khác nhau của Cs/PEG-Cs (ví dụ 1/0, 0,8/0,2, 0,6/0,4, 0,4/0,6, 0,2/0,8 và 0/1) đã được điều chế bởi một phương pháp tự lắp ráp với 250bp Rab7 dsARN tại tỷ lệ khối lượng tổng polyme/Rab7 dsARN là 8 (tương tự như cách tiến hành được mô tả ở trên). chế phẩm bao gồm cả hạt nano được PEGyl hóa và không được PEGyl hóa (ví dụ như PEG-H55/H55 và PEG-H55/Cs) được điều chế theo cách tương tự, duy trì tổng tỷ lệ khối lượng tổng polyme/Rab7 dsARN là 50.

Đặc tính của hạt nano

Kích thước và điện tích bề mặt hạt (điện thế zeta) của hạt nano được xác định bằng cách sử dụng Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, UK). Việc đo kích thước hạt được thực hiện tại góc 173° và nhiệt độ 25°C. Kích thước được biểu hiện dưới dạng đường kính thủy động lực học trung bình z thu được bằng phân tích lũy kế của dấu hiệu tườn quan sử dụng độ nhớt và chỉ số khúc xạ của nước trong tính toán. Điện tích

bề mặt của hạt nano được phân bố trong dung dịch đệm natri axetat được đo sử dụng tế bào mao dẫn cuộn gấp có sẵn (Malvern Instruments, UK).

Lưu giữ và giải phóng dsARN

Sau khi tạo ra hạt nano, lưu giữ dsARN được đánh giá bằng cách điện di gel trong 1,5% agarosa (Sigma) trong TAE (X1, Hy-Labs) với ethidi bromua (Hy-Labs). Gel được chạy ở 100mV trong 30 phút và lưu giữ dsARN được xem dưới ánh sáng tia cực tím.

Nồng độ của hạt nano

Nồng độ của phức hợp Cs/PEG-Cs được thực hiện trong suốt bước tạo phức, bằng cách sử dụng nồng độ gấp 2, 4 và 8 lần của 250bp Rab7 dsARN (0,04, 0,08 và 0,16 $\mu\text{g/ml}$, tương ứng) và Cs/PEG-Cs (0,32, 0,64 và 1,28 $\mu\text{g/ml}$, tương ứng), trong khi giữ thể tích tạo phức cố định (1ml). Tỷ lệ khối lượng tổng polyme/Rab7 là 8 được duy trì cho tất cả phức hợp Cs/PEG-Cs được điều chế. Phức hợp H55/PEG-H55 được cô đặc theo phương thức giống nhau, chỉ duy trì tỷ lệ khối lượng tổng polyme/Rab7 là 50. Sau khi tạo phức, phức hợp được nghiền bằng sóng âm sử dụng bể sóng siêu âm trong 1 giờ ở cường độ 40kHz.

Điều chế thức ăn cho tôm

1,5g thức ăn bao gồm 300 μg dsARN đã được điều chế để sau đó hệ thống hạt nano – PEG-Cs/Cs (80/20), PEG-H55/H55 (50/50) và PEG-H55/H55 (90/10) với 0,02 mol của protamin, có tỉ lệ khối lượng tổng polyme/Rab7 là 8, 50 và 50, tương ứng. Ngăn gọn, phương pháp xử lý hạt nano khác nhau đã được chuẩn bị bằng cách thêm 300 μg 250bp Rab7 dsARN trong 3,75mL dung dịch đệm natri axetat (0,2M, pH 4,6) với vào 3,75mL của PEG-Cs/Cs (80/20), PEG-H55/H55 (50/50) hoặc PEG-H55/H55 (90/10) với 0,02 mol dung dịch protamin (được điều chế trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M, pH 4,6), lắc trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Phức hợp kết quả được làm đông khô sử dụng máy hút chân không. Sau khi làm khô lạnh qua đêm, phức hợp đông khô được hòa tan trong 1ml nước được xử lý DEPC (Biological Industries) và dung dịch kết quả được trộn kỹ lưỡng với 1,5g thức ăn hạt cho tôm thương mại. Khi bột viên đã ngâm hoàn toàn với dung dịch hạt nano, chúng được sấy khô ở 60°C trong lò khí nóng trong 0,5 giờ.

Phân phối qua đường miệng của 250bp Rab7 dsARN ở tôm sử dụng hạt nano trên cơ sở

chitosan được PEGyl hóa.

Tôm *Peneaus vanameii* 6 tuần tuổi được phân chia vào năm nhóm (12 con tôm mỗi nhóm), mà được giữ riêng biệt với nhau để thử nghiệm cảm gen. Trong nhóm I, tôm được cho ăn với thức ăn hạt thương mại. Trong nhóm II, tôm được cho ăn với hạt được điều chế với dsARN tự do (200µg mỗi gam thức ăn). Trong nhóm III, IV, và V, tôm được cho ăn với viên chứa PEG-Cs/Cs (80/20), PEG-H55/H55 (50/50) hoặc PEG-H55/H55 (90/10) với 0,02 mol dung dịch protamin, một cách tương ứng, tất cả bao gồm 200µg dsARN mỗi gam thức ăn. 5 ngày sau khi bắt đầu thử nghiệm (2 lần cho ăn mỗi ngày, cho ăn hàng ngày tương ứng với 5% trọng lượng cơ thể) tôm bị cắt ra và phần mang từ mỗi con tôm đã được thu thập và được làm lạnh ngay lập tức trong nitơ lỏng cho đến khi sử dụng.

Tách chiết ARN và tổng hợp cADN

Các mẫu mang được làm đồng nhất sử dụng giọt thủy tinh trong 1ml chất phản ứng TRIzol® tinh khiết bằng cách sử dụng một máy trộn động cơ chày Argos và tất cả ARN được chiết xuất bằng thuốc thử phân tách ARN TRIzol® (ThermoFisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó xử lý ADNza (TURBO ADN-free™ Kit, Ambion). cADN mạch thứ nhất được tổng hợp bằng cách sử dụng RevertAid First Strand cADN Synthesis theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

PCR thời gian thực

Định lượng của gen Rab7 bằng phương pháp định lượng PCR được thực hiện như mô tả ở trên (Ví dụ 1).

Kết quả

Khả năng liên kết dsARN và tính chất vật lý của hạt nano chitosan được PEGyl hóa

PEG2000-NHS được kết hợp với chitosan không được xử lý và nhóm đầu amin H55, sinh ra polyme chitoan-PEG2000 và H55-PEG2000, tương ứng. Các polyme được PEGyl hóa được trộn với Rab7 để thử nghiệm ái lực liên kết dsARN và để đo kích thước hạt (các hình vẽ từ FIG.6A đến FIG.6C). Trong khi Cs (chitosan không được xử lý) làm cô đặc Rab7 dsARN tới cùng một dạng hạt với đường kính thủy động lực học ~170nm, chỉ có Cs được PEGyl hóa là không thể cô đặc Rab7 do việc giảm nhóm amin có tích điện dương, kết quả là liên kết không hoàn toàn của dsARN với polyme và kích thước

hạt lớn hơn (FIG.6A và FIG.6B). Đo điện thế zeta của hạt nano bao gồm chế phẩm Rab7 dsARN và PEG-Cs/Cs khác nhau tiếp tục hỗ trợ quan sát này, chỉ định tăng giá trị điện tích bề mặt làm tăng thành phần PEG-Cs trong phức hợp (FIG.6C).

Nghiên cứu ảnh hưởng của sự liên hợp PEG về sự ổn định của hạt nano, kích thước của phức hợp được đo sau khi cô đặc gấp 2, 4 và 8 lần của phức hợp. FIG.7A minh họa kích thước hạt (thể hiện ở đơn vị nm) của hạt nano trên cơ sở H55 (H55 không được PEGyl hóa) so với hạt nano trên cơ sở H55 được PEGyl hóa (thành phần polyme là 97% PEG-H55 và 3% Cs). Đường kính trung bình của hạt nano trên cơ sở H55 tăng lên từ 300 đến 1.234nm như là nồng độ hạt tăng 8 lần (từ X1 đến X8). Hạt nano trên cơ sở H55 được PEGyl hóa biểu thị tăng kích thước ít với nồng độ hạt, từ 192 đến 1.050nm (FIG.7A).

Để giảm nồng độ hạt kích thước hạt sau khi cô đặc hạt nano, hạt nano được nghiền bằng sóng âm sử dụng bể siêu âm trong vòng 1 giờ, tiếp theo là đo bổ sung kích thước hạt. FIG.7B minh họa kích thước hạt của hạt nano trên cơ sở H55 so với hạt trên cơ sở H55 được PEGyl hóa sau khi siêu âm, tiết lộ sự khác biệt đáng kể trong trạng thái giữa hai loại phức hợp. Đường kính trung bình của hạt nano trên cơ sở H55 tăng từ 300 đến 1.287nm khi nồng độ hạt tăng 8 lần, bộc lộ không có tác dụng nghiền bằng sóng âm trên kích thước hạt (tức là so với các dữ liệu trình bày trong FIG.7A). Tuy nhiên, hạt nano trên cơ sở H55 được PEGyl hóa biểu thị chỉ tăng kích thước gấp 1.5 lần khi nồng độ hạt tối đa, chứng minh rằng PEG kết hợp cùng với nghiền bằng sóng âm giảm bớt sự cảm ứng nồng độ gây ra bằng cách cung cấp lớp steric xung quanh các hạt.

Tác dụng của PEGyl hóa lên hiệu quả làm câm gen in vivo bằng cách cho ăn hạt nano chitosan-dsARN.

Để xác định xem liệu liên hợp PEG có cải thiện phân phối qua đường miệng Rab7 và câm gen in vivo hay không, 12 con tôm *Penaeus vannamei* trưởng thành (150mg) được cho ăn với 45mg hạt nano dsARN-chitosan đã tạo phức sau đây: PEG-Cs/Cs (80/20); PEG-H55/H55 (50/50) và PEG-H55/H55 (90/10) + protamin, bao gồm 200µg dsARN mỗi gam thức ăn, chế độ ăn Rab7 (Rab7 dsARN tự do) hoặc thức ăn thương mại (thức ăn tôm thô) hai lần một ngày trong 5 ngày với tổng liều hàng ngày là 5% sinh khối. 48 giờ sau lần ăn cuối cùng, tất cả tôm làm chết và tổng ARN được chiết xuất từ các mô tôm để phân tích định lượng PCR thời gian thực. Biểu hiện Rab7 mRNA

tương đối được minh họa trong FIG.8. Phân phối qua đường miệng phức hợp PEG-Cs/Rab7 không gây ra sự cảm gen đáng kể bất kỳ. Tuy nhiên, giảm xấp xỉ 5 lần trong biểu hiện Rab7 được quan sát thấy ở tôm mà ăn hạt nano trên cơ sở PEG-H55/H55 (50/50) (biểu hiện gen 22%), so sánh với tôm đối chứng được cho ăn dsARN tự do. Những kết quả này đưa ra giả thuyết là Rab7 dsARN được tạo phức hợp với polyme H55 được PEGyl hóa và đưa vào chế phẩm ăn có thể tham gia vào các tế bào tôm và kích hoạt tạo ra ARNi, ứng chế mức Rab7 mRNA trong vật chủ. Hơn nữa, kết hợp của các phân tử PEG vào mạch chính của H55 tiếp tục cải thiện việc phân phối qua niêm mạc của hạt nano PEG-H55/Rab7, dẫn đến sự cảm lớn hơn đáng kể của sự biểu hiện gen Rab7 của vật chủ.

Tóm lại, kết quả được đề xuất kèm theo đây chỉ ra rằng chitosan biến đổi về mặt hóa học với lượng giảm của các nhóm amin có thể liên kết dsARN, tự lắp ráp thành hạt nano tạo phức dsARN-chitosan, đó là tác dụng trong việc làm cảm gen đích trong vật chủ khi ăn. Sự PEGyl hóa ở mạch chính chitosan tiếp tục tăng cường tác động cảm gen của hạt nano dsARN-chitosan.

Ví dụ III - Độ ổn định của hạt nano ARN-chitosan trong môi trường chứa nước

Vật liệu và phương pháp

Để làm sáng tỏ ảnh hưởng của mức độ khử axetyl hóa (DD) với độ ổn định hạt, chế phẩm phức hợp với 250bp Rab7 dsARN và dẫn xuất chitosan với mức độ khác nhau của khử axetyl hóa đã được điều chế tại tỷ lệ khối lượng polyme/dsARN là 30. Dẫn xuất N-axetyl hóa H55 (DD55%), H42 (DD42%) và H35 (DD35%) được hòa tan với nồng độ 1,2 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M (pH 4,6). Thể tích tương đương của dung dịch dsARN Rab7 (40 µg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M) và dung dịch polyme được trộn nhanh chóng dưới độ lắc cao trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại RT. Tổng hợp hạt nano được lắp ráp đã được sử dụng mà không cần tiếp tục làm sạch. Sau khi điều chế phức hợp, độ pH của dung dịch được làm tăng với NaOH 1M. Độ ổn định của phức hợp được phân tích bằng cách điện di gel trong 1,5% agarosa (Sigma) trong TAE (X1, Hy-Labs, Rehovot, Israel) với ethidi bromua (Hy-Labs). Gel được chạy ở 100mV trong 30 phút và lưu giữ dsARN được hiển thị dưới ánh sáng tia cực tím. 100bp ADN (10µl) được sử dụng như dấu hiệu nhận biết.

Khả năng tạo phức để bảo vệ dsARN khỏi sự phân hủy enzym: Thử nghiệm RNaza A

Độ ổn định phức hợp và khả năng để bảo vệ dsARN khỏi sự thoái hóa đã được kiểm tra bằng cách sử dụng thử nghiệm phân hủy enzym RNaza A. Ngắn gọn, dsARN tự do và phức hợp H55/dsARN và H42/dsARN trước hết được tiếp xúc với RNaza A (Promega, Cat # A7970, Madison, WI) trong một giờ ở 37°C (20ng RNaza trên mỗi 1µg phức hợp ARN). Sau đó, enzyme được làm bất hoạt bằng chất ức chế RNaza (80 đơn vị cho mỗi 1µg phức hợp ARN, chất ức chế RNaza Ribolock, 20U/µl, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) và dsARN được giải phóng từ hạt nano bằng cách ủ trong 1 giờ tại 37°C với Chitosanaza (Chitosanaza từ *Streptomyces* sp. N174, Calbiochem, Cat# 220477-10U, CA, USA). dsARN tự do được làm kết tủa với isopropanol lạnh. Hạt được hòa tan lại trong 30µl của nước DEPC và được áp dụng điện di gel agarosa 1,5% trong 30 phút tại 100V.

Kết quả

Tác dụng của mức độ khử axetyl hóa chitosan về sự ổn định hạt trong môi trường chứa nước

Chitosan được đặc trưng bởi giá trị pKa ~ 6,5. Như vậy, tại pH có tính axit (dưới pKa của nó) amin sơ cấp trở nên tích điện dương, tạo điều kiện cho Cs liên kết với dsARN tích điện âm. Kết quả pH cao hơn trong điều kiện điện tích dương ít hơn của polyme. Như vậy, tính ổn định của chế phẩm hạt nano trong môi trường chứa nước (đặc trưng bởi độ pH trung tính) là rất quan trọng. Các hình vẽ FIG.9A đến FIG.9D biểu hiện tính ổn định của các phức hợp được điều chế từ 250bp dsRab7 và các dẫn xuất chitosan có một loạt các mức độ khử axetyl hóa (H55, H42 và H35) tại giá trị pH khác nhau và cho các thời hạn ủ khác nhau. Để làm sáng tỏ ảnh hưởng của mức độ khử axetyl hóa (DD) về độ ổn định hạt, tất cả phức hợp được điều chế tại cùng một tỷ lệ khối lượng polyme/dsARN (30). Sau khi điều chế phức hợp, độ pH của dung dịch được làm tăng với NaOH 1M. Sau đó, độ ổn định của phức hợp được phân tích bằng cách phân tách chế phẩm kết quả bằng cách điện di gel.

Các hình vẽ từ FIG.9A đến FIG.9C cho thấy các hạt nano chitosan-dsARN trên cơ sở H55 (NP1, DD = 55%) là ổn định trong điều kiện pH ở nước. Hạt nano chitosan-dsARN với mức thấp hơn của khử axetyl hóa [tức là H42 (NP2, DD = 42%) và H35 (NP3, DD = 35%)], là dễ ảnh hưởng hơn đến giải phóng dsARN từ hạt nano. FIG.9D tiếp tục chứng tỏ độ ổn định của hạt nano chitosan-dsARN trên cơ sở H55 sau 4 giờ

(240 phút) ủ ở pH 7 và 28°C, cho thấy không giải phóng hơn 5% dsARN tự do trong suốt toàn bộ thời gian.

dsARN được tạo phức hợp với chitosan có khả năng chống phân hủy enzyme

Khả năng của chất mang để bảo vệ lượng tải của nó khỏi sự thoái hóa nucleaza là tính chất quan trọng cho việc thực hiện có hiệu quả công nghệ cấyARN, để chống lại quá trình tiêu hóa nucleaza cả trong quá trình phân phối hạt nano và trong tế bào đích. Để giải quyết chúng, mức độ chống phân hủy enzyme được đánh giá đối với các hạt nano khác nhau trong sự có mặt của dung dịch RNaza A (sử dụng nồng độ RNaza A có khả năng phân hủy hoàn toàn dsARN tự do trong vòng 30 phút). FIG.10 cho thấy rằng hạt nano chitosan-dsARN có chứa dẫn xuất chitosan H55 (NP1, DD = 55%) hoặc H42 (NP2, DD = 42%) có thể bảo vệ hoàn toàn hoặc một phần, tương ứng, dsARN khỏi phân hủy enzyme ở pH 7, trong khi dsARN tự do là hoàn toàn suy thoái sau khi tiếp xúc với RNaza A.

Tóm lại, các dữ liệu trình bày trong bản mô tả này cung cấp bằng chứng mạnh mẽ cho độ ổn định được tăng cường của cấyARN khi được tạo phức hợp với dẫn xuất chitosan cụ thể trong hạt nano chitosan-ARN.

Ví dụ IV - Làm cấy gen với hạt nano chitosan-ssARN

Hiệu quả của việc thay thế ARN sợi kép (dsARN) với ARN mạch đơn (ssARN) trong hạt nano chitosan-ARN để sử dụng trong việc làm cấy gen đã được nghiên cứu.

Vật liệu và phương pháp

Sản xuất ARN

Rab7-ssARN được tổng hợp in vitro. Để tạo ra khuôn ADN cho quá trình tổng hợp ssARN, đoạn tổng hợp chứa *Litopenaeus vannamei* ở trình tự một phần protein liên quan đến Ras (Rab7, số truy cập # JQ581679) (SEQ ID NO: 46, đoạn Rab7 với vòng lặp) được tổng hợp. Đoạn này được sử dụng như khuôn để khuếch đại trình tự 250 b Rab7 có nghĩa và đối nghĩa sử dụng mỗi sau đây:

Đoạn có nghĩa: T7 rab250 mỗi xuôi:
GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTGGGTAACAAGATTGATCTGGAG
(SEQ ID NO: 80); rab250 mỗi ngược CATCCTGTTTAGCCTTGTTGTC (SEQ ID NO: 50);

Đoạn đối nghĩa: rab7 mỗi xuôi TGGGTAACAAGATTGATCTGGAG (SEQ ID NO: 51);
T7 rab7 mỗi ngược
GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCATCCTGTTTAGCCTTGTTGTC (SEQ ID NO: 52).

Trong quá trình phiên mã in vitro được thực hiện bằng Hệ thống ARNi biểu hiện T7 RiboMAX™ (Promega) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Phản ứng được ủ trong 1 giờ tại 37°C, sau đó xử lý ADNza và kết tủa etanol. ARN được tái huyền phù trong nước nucleaza tự do và nồng độ của nó được xác định bằng việc đo độ quang phổ UV tại bước sóng 260nm và điện di gel agarosa.

Đoạn có nghĩa:

TGGGTAACAAGATTGATCTGGAGAATAGGGCGGTATCGACGAAGCGAGCA
CAACAATGGTGTTCATAGTAAAAATGAAGTTCCCTACTTTGAAACTAGTGCA
AAGGAAGCTATTAATGTGGAGCTAGCTTTCCAGACCATTGCTCGCAATGCT
CTTGCTCAGGAGTCAGAGGTGGAGCTGTACAATGAGTTTCCAGACCAGAT
CAAATTGACCAATGACAACAAGGCTAAACAGGATG (SEQ ID NO. 53).

Đoạn đối nghĩa:

CATCCTGTTTAGCCTTGTTGTCATTGGTCAATTTGATCTGGTCTGGAA
ACTCATTGTACAGCTCCACCTCTGACTCCTGAGCAAGAGCATTGCGAGCAA
TGGTCTGGAAAGCTAGCTCCACATTAATAGCTTCCTTTGCACTAGTTTCAA
AGTAGGGGAACCTTCATTTTTTACTATGACACCATTGTTGTGCTCGCTTCGTCGA
TACCGCCCTATTCTCCAGATCAATCTTGTTACCCA (SEQ ID NO. 54).

Điều chế hạt nano chitosan-ARN

Chế phẩm với tỷ lệ khối lượng chitosan/ARN khác nhau được điều chế bằng phương pháp tự lắp ráp trong khi vẫn giữ lượng ARN (ssARN hoặc là dsARN) không đổi (20 µg/mL). Thứ nhất, chitosan được điều chế ở nồng độ 1 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M (pH 4,6). Dung dịch hoạt động với nồng độ 0,08-0,8 mg/ml đã được làm từ nguyên liệu gốc bằng cách pha loãng với cùng một dung dịch đệm. Thể tích tương đương của dung dịch Rab7 ssARN hoặc dsARN (0,04 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M) và dung dịch chitosan được trộn nhanh chóng dưới độ lắc mạnh trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại RT. Hạt nano được lắp ráp đã được sử dụng mà không cần tiếp tục làm sạch. Vì nồng độ ARN không đổi đối với tất cả dung dịch hạt nano,

thao tác với nồng độ chitosan thay đổi tỷ lệ khối lượng polyme/ARN.

Đặc tính về kích thước hạt nano

Kích thước hạt của hạt nano chitosan/ARN được xác định bằng cách sử dụng Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, UK). Việc đo kích thước hạt được thực hiện tại góc 173° và nhiệt độ 25°C . Kích thước được biểu hiện dưới dạng đường kính thủy động lực học trung bình z thu được bằng phân tích lũy kế của dấu hiệu tườn quan sử dụng độ nhớt và chỉ số khúc xạ của nước trong tính toán.

Lưu giữ và giải phóng ARN

Sau khi tạo ra hạt nano, lưu giữ dsARN được đánh giá bằng cách điện di gel trong 1,5% agarosa (Sigma) trong TAE (X1, Hy-Labs) với ethidi bromua (Hy-Labs). Gel được chạy ở 100mV trong 30 phút và lưu giữ ARN được hiển thị dưới ánh sáng tia cực tím UV, cùng với chỉ thị ADN 100bp (100 $\mu\text{g/ml}$).

Độ ổn định của ssARN với sự có mặt của RNaza

Khả năng của phức hợp các chitosan/ARN để bảo vệ ssARN chống lại quá trình tiêu hóa RNaza được nghiên cứu. Ngắn gọn, chế phẩm chitosan/ssARN khác nhau (tỉ lệ khối lượng là 8, 15 và 30) có chứa 2 μg ssARN đã được ủ với RNaza A (0,4 ng/ μg của ssARN) ở 37°C trong 1 giờ. Sau khi ủ với RNaza A, các mẫu chịu sự bất hoạt RNaza bằng chất ức chế RNaza Ribolock (20 U/ μl , 4 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ của ssARN) trong 30 phút. ssARN được chuyển từ chất mang chitosan bằng cách ủ mẫu với 10ml dung dịch Chitosanaza (0,001 U/ μl) ở 37°C trong 1 giờ. ssARN được chiết xuất được phân tích trên điện di gel agarosa 1,5% thực hiện tại 100V trong 30 phút. Đối chứng dương chứa ssARN trần đã được kiểm tra dưới các điều kiện tương tự.

Làm câm gen ở tôm bằng cách tiêm ss và dsARN

25 con tôm *Peneaus vanameii*, với trọng lượng trung bình là 2g được chia thành năm nhóm (5 con tôm cho mỗi nhóm) được giữ riêng biệt cho thí nghiệm câm gen. Trong nhóm I (đối chứng âm), tôm được tiêm với dung dịch NaCl 1%. Trong nhóm II, III và tôm được tiêm với Rab7ARN có nghĩa 250b tự do (SEQ ID NO: 53) và Rab7 ARN đối nghĩa (SEQ ID NO: 54) (0,5 μg ARN mỗi g tôm), tương ứng. Trong nhóm IV (đối chứng dương) tôm được tiêm với Rab7ARN có nghĩa 250bp tự do (SEQ ID NO: 53) (0,5 μg ARN mỗi g tôm). Trong nhóm V, tôm được tiêm với hỗn hợp của 250b Rab7

ARN có nghĩa và đối nghĩa (0,5µg ARN mỗi g tôm). 5µl từ mỗi lần xử lý đã được tiêm cho mỗi con tôm sử dụng ống tiêm thủy tinh Hamilton 10ml với kim 26g.

Thu thập mẫu, tách chiết ARN và tổng hợp cADN

24 giờ sau khi tiêm, tôm được cắt ra và phần mang từ mỗi con tôm được thu thập, làm đông lạnh ngay lập tức trong dung dịch nito lỏng và lưu trữ nito lỏng đến khi sử dụng. Các mẫu được làm đồng nhất sử dụng giọt thủy tinh trong 1ml chất phản ứng TRIzol® bằng cách sử dụng một máy trộn mô tơ chày Argos và tất cả ARN được chiết xuất bằng thuốc thử phân tách ARN TRIzol® (ThermoFisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sau đó xử lý ADNza (TURBO ADN-free™ Kit, Ambion). cADN sợi thứ nhất được tổng hợp bằng cách sử dụng RevertAid First Strand cADN Synthesis (Thermo Fisher, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

PCR thời gian thực

Định lượng biểu hiện gen Rab7 (số truy cập #FJ811529) bằng phương pháp định lượng PCR được thực hiện như mô tả bằng (Vatanavicharn và cộng sự, 2014). Trình tự môi để phân tích qRT đã được lựa chọn từ đoạn Rab7 mà không phải là một phần của đoạn lựa chọn để tạo ra dsARN để tránh các lỗi gây ra bởi việc truyền dsARN. 2µl từ cADN được sử dụng trong phản ứng 10ml được điều chế sử dụng đầu dò qPCRBIO Mix Lo-ROX (PCR Biosystems) và thử nghiệm qPCR PrimeTime® (IDT) có chứa các đoạn môi và đầu dò sau: Rab7F GGGATACAGCTGGTCAAGAAA (SEQ ID NO: 38); Rab7R CGAGAGACTTGAAGGTATTGGG (SEQ ID NO: 39) và FAM đầu dò được gắn nhãn – CGAGGAGCTGATTGTTGTGTTCTCGT (500nM môi và đầu dò 250nM) (SEQ ID NO: 40).

PCR được thực hiện trong hệ thống phát hiện PCR thời gian thực CFX96 Touch™ sử dụng điều kiện chu kỳ nhiệt mặc định. Giá trị Ct RT-PCR thời gian thực thu được cho Rab7 mARN được chuẩn hóa ngược với các giá trị Ct thu được cho EF1α mARN (số truy cập # GU136229) sử dụng đoạn môi và đầu dò sau đây: EF1aF GTGGAGACCTTCCAACAGTATG (SEQ ID NO: 41), EF1aR CCTTCTTGTTGACCTCCTTGAT (SEQ ID NO: 42) và FAM đầu dò được gắn nhãn TGCCTGACATGAAGCAGACGG (SEQ ID NO: 43). Giá trị Ct delta trung bình được xác định cho mỗi lần xử lý (tối thiểu 5 con tôm mỗi lần) và quá trình định lượng liên quan đến đối chứng không được xử lý thiết lập về 1.

Kết quả

Giảm kích thước hạt sử dụng ARN có nghĩa đơn thay cho dsARN

Phân tích kích thước (FIG.11) bộc lộ rằng phức hợp của chitosan hoặc dẫn xuất chitosan với 250b Rab7 ARN có nghĩa được đặc trưng bởi kích thước phức hợp nhỏ hơn đáng kể (~100nm) so với phức hợp của chitosan hoặc dẫn xuất chitosan với đoạn dsRab7 (~170nm) (FIG.12).

Bên cạnh đó, tạo phức chitosan hoặc dẫn xuất chitosan với đoạn ngắn hơn của dsARN (ví dụ, 70, 125 và 250bp) không dẫn đến giảm đáng kể kích thước hạt nano này.

Khả năng tạo phức để bảo vệ ssARN khỏi sự phân hủy enzym-

Sự phân hủy ARN do tác động nucleaza là một trong những rào cản quan trọng nhất đối với phân phối ARN. Do đó, khả năng của phức hợp chitosan-ARN để giảm thiểu, hoặc thậm chí loại bỏ sự sẵn có của phức hợp ARN đối với sự phân hủy RNaza là một yếu tố quan trọng của phức hợp chitosan-ARN. Từ các kết quả (FIG.13), ssARN trần được tiêu hóa hoàn toàn khi ủ với RNaza A ở 37°C trong 1 giờ (bước II). Mặt khác, ssARN được kết hợp trong phức hợp chitosan ở tỷ lệ khối lượng chitosan/ssARN là 30 vẫn nguyên vẹn.

Làm câm gen Rab7 sau khi tiêm ssRab7ARN và dsRab7ARN-

Khi các đoạn Rab7 ARN (Rab7 và dsRab7 có nghĩa và đối nghĩa 250b) đã được tiêm vào tôm, việc làm câm của sự biểu hiện gen Rab7 được quan sát cho cả hai sợi đơn có nghĩa và đối nghĩa, cũng như trình tự Rab7 ARN sợi kép (FIG.14). Đáng ngạc nhiên, hiệu quả làm câm gen của ssRab7 ARN có nghĩa là tương đương với ARN đối nghĩa bổ sung đơn.

Làm câm gen Rab7 in-vivo bằng cách tiêm chitosan/ssRab7ARN và chitosan/dsRab7ARN-

Khi các phức hợp chitosan và dẫn xuất chitosan với trình tự Rab7 ARN (Rab7 có nghĩa và đối nghĩa 250b và dsRab7 250bp) đã được tiêm vào tôm, cả hai trình tự ARN sợi đơn (Rab7ARN có nghĩa và đối nghĩa) tạo phức với chitosan được sản xuất có hiệu quả làm câm gen so với làm câm gen được quan sát với việc tiêm phức hợp chitosan/dsRab7 (FIG.15). Hơn nữa, tiêm phức hợp chitosan/ss- Rab7ARN có nghĩa sau khi ủ với RNaza A (mà làm suy giảm ssARN không được bảo vệ) kết quả là làm câm gen Rab7 đáng kể,

tương tự như phức hợp khác được tiêm, chỉ ra rằng tạo phức ARN trong hạt nano chitosan-ARN thể hiện khả năng chống thoái hóa RNaza đáng kể của trình tự câm gen.

Tóm lại, những kết quả này chỉ ra rằng cả dsARN và ssARN có thể có hiệu quả trong việc làm câm gen đích ở động vật giáp xác (ví dụ như tôm), và đáng ngạc nhiên, ssARN có nghĩa và đối nghĩa có hiệu quả trong việc làm câm gen. Quan trọng là quan sát thấy rằng sự tạo phức của dsARN hoặc ssARN vào hạt nano chitosan-ARN thể hiện khả năng chống thoái hóa RNaza đáng kể, và phức hợp chitosan-ARN này có thể là phương pháp hiệu quả cho việc phân phối của trình tự câm gen tới động vật giáp xác.

Ví dụ V: Phân phối qua đường miệng của Rab7 ARN có nghĩa sợi đơn ở tôm sử dụng hạt nano trên cơ sở chitosan được axetyl hóa.

Phân phối ARN thông qua đường ăn của hạt nano trên cơ sở chitosan N-axetyl hóa một phần được kiểm tra để xác định xem cho ăn hạt nano có thể hay không kích hoạt ARNi và làm câm gen *in vivo*.

Vật liệu và phương pháp

Tôm *Peneaus vanameii* 6 tuần tuổi được phân chia vào sáu nhóm (12 con tôm mỗi nhóm), mà được giữ riêng biệt với nhau để thử nghiệm câm gen. Trong nhóm I, tôm được cho ăn với thức ăn hạt thương mại. Trong nhóm II, tôm được cho ăn với hạt được điều chế với 250b Rab7 ARN có nghĩa tự do (SEQ ID NO: 53) (200µg ARN mỗi g thức ăn). Trong nhóm III, IV, V và VI, tôm được cho ăn với viên chứa phức hợp trên cơ sở H35(DD=35%), H42(DD=42%), H55(DD=55%) và chitosan không được xử lý (Cs, DD=83%), một cách tương ứng, tất cả bao gồm 200µg 250b Rab7 ARN có nghĩa (SEQ ID NO: 53) mỗi gam thức ăn. Một cách tùy chọn, thức ăn dạng viên có thể chứa axit glucuronic - hoặc biotin kết hợp với hạt nano chitosan-ARN, một mình hoặc kết hợp với hạt nano chitosan-ARN được khử axetyl.

Tôm được cho ăn hai lần mỗi ngày trong 5 ngày (thức ăn hàng ngày tương ứng với 5% trọng lượng cơ thể). Sau đó, tôm được cắt ra và phần mang từ mỗi con tôm được thu thập và cho ngay lập tức vào trong nơ lỏng cho đến khi sử dụng.

Đánh giá: Biểu hiện Rab-7 ở mô tôm, được đo ví dụ bằng RT-PCR (như mô tả ở trên) có thể sau đó tương quan với lượng và loại hạt nano ARN chitosan-Rab7 cung cấp trong thức ăn, để làm sáng tỏ bất kỳ tác dụng của chitosan-ARN trên việc làm câm gen

Rab7 của tôm.

Ví dụ VI - Bảo vệ tôm chống lại virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) bằng cách làm câm gen virus với hạt nano Chitosan-ARN

Hiệu quả của việc cung cấp hạt nano chitosan-ARN bao gồm trình tự gen virus để làm câm gen virus trong tôm đã được nghiên cứu bằng cách tiêm hạt nano chitosan trong tôm nhiễm WSSV.

Phương pháp

Nhắm trúng đích gen virus

Các trình tự dsARN đặc hiệu với WSSV được điều chế cho các thử nghiệm thách thức WSSV để đánh giá hiệu quả của các trình tự ARN và các hạt nano chitosan-ARN trong việc bảo vệ tôm chống lại bệnh do virus WSSV.

Tạo ra ARN

Để tạo ra WSSV VP28 250bp dsARN, khuôn ADN tổng hợp sau đây là được tổng hợp về mặt thương mại:

CCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACGGATCCGGCAGGTA
TCACAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGA
CAAACATGGATGAAAACCTCCGCATTCCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAG
GCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCTTTGACAGCGACACCTTGGGCAAAA
TCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAGGAAGAAGATGCG
GATCTTGTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGG
GCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAA
GAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCA
AAGGCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTCTATTG
ATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAA
TTGCAGCTACCGCCGGTGGAAATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTACCT
ACTCTGGCACTGAGACCGAGTAAGCGGCCGCAACTCGAGAACG (SEQ ID
NO:55).

Đoạn này được sử dụng làm khuôn để khuếch đại trình tự VP28 250bp có nghĩa sử dụng mỗi: XbaI VP28-3 mỗi xuôi
GACTATCTAGACATTCAAGGTGTGGAACAACAC (SEQ ID NO: 56) và NcoI

VP28-3 mỗi ngược ACGTACCATGGCTCGGTCTCAGTGCCAGAGT (SEQ ID NO: 57). Sản phẩm PCR được nhân bản thành pET9a-Rab7 125 ARNi (được mô tả trước đó, có chứa vòng lặp đoạn giữa vị trí PstI và NcoI của nó) bằng cách sử dụng vị trí giới hạn XbaI + NcoI. VP28 đối nghĩa được khuếch đại PCR sử dụng cùng một khuôn với mỗi sau đây: BamHI VP28-3 mỗi xuôi ACATAGGATCCCATTC AAGGTGTGGAACAACAC (SEQ ID NO: 81) và PstI VP28-3 mỗi ngược ACAGACTGCAGCTCGGTCTCAGTGCCAGAGT (SEQ ID NO: 58) và được nhân bản bằng BamHI, PstI để tạo ra plasmit cuối cùng - iARN pET9a-VP28 250. Plasmit tái tổ hợp (ARNi pET9a-VP28 250) có chứa đoạn lặp đảo ngược của vòng lặp gốc VP28 được biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt vào ribonucleaza III (RNaza III) đột biến E.coli sợi HT115. Sự biểu hiện của cấu trúc kẹp tóc VP28 được gây ra bằng cách thêm Isopropyl- β -D Thiogalactosit (IPTG) 0,4mM vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Môi trường nuôi cấy được thu 4 giờ sau khi gây ra IPTG. ARN sợi đơn ở vi khuẩn (ssARN) và vùng vòng lặp của vòng lặp gốc VP28 được thủy phân với ribonucleaza A (RNaza A). Sau đó, dsARN-VP28 được chiết xuất bởi Chất phản ứng phân tách ARN TRIzol® (ThermoFisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sau phiên mã, và xử lý RNaza, trình tự VP28 250bp đã được tạo ra như sau:

ATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGT
ATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCGGTAGCTCC
AACACCTCCTCCTTCACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACC
TTTGTGTGTGGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGA
AATCTTTTCGACATGTACGTGCACGTCACCTACTCTGGCACTGAGACCGAG
(SEQ ID NO:59).

Nồng độ dsARN-VP28 được xác định bằng cách đo độ quang phổ UV tại 260nm và điện di gel agarosa.

Việc tạo ra đoạn VP28 125bp được thực hiện in vitro. Để tạo ra đoạn VP28 125bp, đoạn ADN VP28 tổng hợp (SEQ ID NO: 55) được sử dụng làm khuôn để khuếch đại trình tự VP28 125bp có nghĩa và đối nghĩa sử dụng mỗi sau đây:

Đoạn có nghĩa: T7 VP28 125

Mỗi xuôi:

GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGGCAGAATCTCACCTTTGAGG (SEQ

ID NO: 60);

Mỗi ngược VP19-VP28 GTTGGAGCTACCGACAAAGG (SEQ ID NO. 61);

Đoạn đối nghĩa: VP28 125:

Mỗi xuôi GGCAGAATCTCACCTTTGAGG (SEQ ID NO. 62);

T7 mỗi ngược VP19-VP28

GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTTGGAGCTACCGACAAAGG (SEQ ID NO. 63).

Trong quá trình phiên mã in vitro được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống ARNi biểu hiện T7 RiboMAX™ (Promega) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Phản ứng được ủ trong 1 giờ tại 37°C, sau đó xử lý ADNza và kết tủa etanol. ARN được tái huyền phù trong nước nucleaza tự do và nồng độ của nó được xác định bằng đo độ quang phổ UV tại 260nm và điện di gel agarosa.

Đoạn có nghĩa:

GGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACAC
ATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAACC
CATCAAAGGCCTTTGTCTGGTAGCTCCAAC (SEQ ID NO. 64).

Đoạn đối nghĩa:

GTTGGAGCTACCGACAAAGGCCTTTGATGGGTAAATCTTTGGCACCA
TCTGCATACCAGTGATGTTGATCTTTCTTGATGTGTTGTTCCACACCTTGAA
TGTTCCCTCAAAGGTGAGATTCTGCC (SEQ ID NO. 65).

Để tạo ra hỗn hợp của bốn đoạn gen WSSV-VP28, VP19, rr2 và wsv477 - cùng một phương pháp in vitro đã được sử dụng bằng cách sử dụng trình tự ADN tổng hợp:

GACAGATATGGCCACCACGACTAACACTCTTCCTTTCGGCAGGACCG
GAGCCCAGGCCGCTGGTCCTTCTTACACCATGGAAGATCTTGAAGGCTCCA
TGTCTATGGCTCGCATGGGTCTCTTTTGTATCGTTGCTATCTCAATTGGTAT
CCTCGTCCTGGCCGTCATGAATGTATGGATGGGACCAAAGAAGGACAGCG
ATTCTGACACTGATAAGGACACCGATGATGATGACGACACTGCCAACGAT
AACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGATGCTTCT
GGCTGGGTCCGCTCTTCTGTTCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTTATGTCT

TACCCCAAGAGGAGGCAGTAAGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTC
AAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTATGCAGAT
GGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCGGTAGCTCCAACACCTC
CTCCTTCACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGT
GGTACCACCTTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGAAATCTTTTC
GACATGTACGTGCACGTCACCTACTCTGGCACTGAGACCGAGCTAGAAAA
GCACTATAATGTTACCAACCCCTTCCCATTTCATGGACAATATTTCCCTCGA
GAATAAGACCAACTTTTTTGAAGAGAGTCGCCGAGTATCAACGTGCCC
AGGTCATGGCTTCTATCAATAAGATCAAGAAGGACCAACAAACCCAAGAA
ACTGGTTCTCCTCTCCCAATTCTGACTGCACCTCCTCCAGTCTCTTCCTCAT
CATCCGAACAAGAAGATGTTGAAGACGGCGTCGGGGACTACATCAGTTAT
GACGATTTTATCAGTT(SEQ ID NO: 66)

Bảng 5: Trình tự mỗi để tạo ra trong ống nghiệm bằng cách xử lý bằng ARN nhằm trúng đích virus đa gen tổ hợp.

Tên mỗi	Trình tự	Chiều dài trình tự iARN	SEQ ID NO:
Dung hợp VP19-VP28 mỗi xuôi	ATAACGATGATGAGGACAAATATAAG	250	67
Dung hợp VP19-VP28 mỗi ngược	GTTGGAGCTACCGACAAAGG	250	61
Dung hợp VP19-VP28 mỗi xuôi T7	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATA ACGATGATGAGGACAAATATAAG	250	68
Dung hợp VP19-VP28 mỗi ngược T7	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTT GGAGCTACCGACAAAGG	250	63
Mỗi xuôi rr2	GTTACCAACCCCTTCCCATTTC	250	69
T7 rr2 Mỗi xuôi	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGTT ACCAACCCCTTCCCATTTC	250	70
rr2 mỗi ngược	AATCGTCATAACTGATGTAGTCC	250	71
T7 rr2 Mỗi ngược	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAAT CGTCATAACTGATGTAGTCC	250	72
T7 wsv477 Mỗi	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGTAT	250	73

xuôi	GGATACTGCAACCAAGTGGA		
wsv477 mỗi ngược	CTCGAAAACACGTTCTTAAACC	250	74
Mỗi xuôi_WSV477	TATGGATACTGCAACCAAGTGGA	250	75
T7 wsv477 mỗi ngược	GGATCCTAATACGACTACTATAGGCTC GAAAACACGTTCTTAAACC	250	76

Ba trình tự được tạo ra là:

Dung hợp VP19-VP28 (đoạn 250bp bao gồm từ 125bp của VP28 và 125bp của VP19):

ATAACGATGATGAGGACAAATATAAGAACAGGACCAGGGATATGAT
GCTTCTGGCTGGGTCCGCTCTTCTGTTCTCGTTTCCGCCGCCACCGTTTTT
ATGTCTTACCCCAAGAGGAGGCAGTAAGGCAGAATCTCACCTTTGAGGGA
ACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACATCACTGGTAT
GCAGATGGTGCCAAAGATTAACCCATCAAAGGCCTTTGTCGGTAGCTCCA
AC(SEQ ID NO: 77)

Rr2 (đoạn 250bp):

GTTACCAACCCCTTCCCATTTCATGGACAATATTTCCCTCGAGAATAA
GACCAACTTTTTTGAAAAGAGAGTCGCCGAGTATCAACGTGCCCAGGTCA
GGCTTCTATCAATAAGATCAAGAAGGACCAACAAACCCAAGAACTGGTT
CTCCTCTCCCAATTCTGACTGCACCTCCTCCAGTCTCTTCTCATCATCCGA
ACAAGAAGATGTTGAAGACGGCGTCGGGGACTACATCAGTTATGACGATT
(SEQ ID NO: 78)

Wsv477 (đoạn 250bp):

TATGGATACTGCAACCAAGTGATGGCTGAAATTATTAGAGAGAAG
AGGGGCAATATTCAAGAAATAAAAGTGACCCCTAGAGTAGTCTTCAATGG
CAATGGTTGTAGTGCATGTTTCTCTAACACTAAGAGAACTTGTATAACTT
TGGAACAACTATAACAATGTTGTACATTGTGATTTGTTGTGCCCTTTTGC
AAGGCATAGGATTGTACATTTCTTATAATGGTTTAAGGAACGTGTTTTCGA
G(SEQ ID NO: 79)

Tổng hợp chitosan kết hợp axit glucuronic

D-axit glucuronic (Mw 194,14Da, Sigma-Aldrich) được liên hợp với nhóm đầu amin chitosan để tạo ra polyme Glu-chitosan. Ngắn gọn, 0,5g chitosan ((HMC's Chitosan 80/20, Mw 40-150kDa) được hòa tan trong 100mL 3% axit axetic dưới điều kiện khuấy cường độ lớn trong 2 giờ. D-axit glucuronic (0,42g, 1 đương lượng/[glucosamin]) được cân và thêm vào dung dịch chitosan và dung dịch thu được được khuấy trong vòng 1 giờ. Sau đó, pH của dung dịch được điều chỉnh tới 6,3 sử dụng NaOH 5M. N-(3-Dimethylaminopropyl-) N'-etylcarbodiimide hydroclorua (Mw 191,70Da, Sigma-Aldrich) được cân (0,412g, 1 đương lượng/[Gluc.axit]) và thêm vào dung dịch chitosan-axit glucuronic. N-hydroxysuccinimide (Mw 115,09Da, Sigma-Aldrich) được cân thêm (0,124g, 1 đương lượng/[EDC]) và thêm vào dung dịch Chitosan-axit glucuronic. Dung dịch kết quả được khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp kết quả đã được thẩm tách với màng thẩm tách (SpectrumLabs, kích thước lỗ 12-14kDa) dựa vào nước cất trong 72 giờ, và dung dịch được làm đông khô sau đó (máy làm đông khô bằng chân không Labconco).

Tổng hợp chitosan kết hợp biotin

Biotin (Mw 244,31Da, Sigma-Aldrich) được liên hợp với nhóm đầu amin chitosan để cung cấp polyme Biotin-chitosan. Ngắn gọn, 0,5g chitosan ((HMC's Chitosan 80/20, Mw 40-150kDa) được hòa tan trong 100mL axit axetic 3% dưới điều kiện khuấy cường độ lớn trong 2 giờ. Biotin (0,53g, 0,7 đương lượng/[glucosamin]) được hòa tan trong 10ml của N, N-dimethyl formamit trong 1 giờ trên máy khuấy từ. Sau đó, biotin đó được thêm vào dung dịch chitosan và dung dịch thu được được khuấy trong vòng 1 giờ. pH của dung dịch được điều chỉnh tới 6,3, sử dụng NaOH 5M. N-(3-Dimethylaminopropyl-) N'-etylcarbodiimide hydroclorua (Mw 191,70Da, Sigma-Aldrich) được cân (0,412g, 1 đương lượng/[biotin]) và thêm vào dung dịch Chitosan-biotin. N-hydroxysuccinimide (Mw 115,09Da, Sigma-Aldrich) được cân thêm (0,124g, 1 đương lượng/[EDC]) và thêm vào dung dịch Chitosan-biotin. Dung dịch kết quả được khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp kết quả đã được thẩm tách với màng thẩm tách (SpectrumLabs, kích thước lỗ 12-14kDa) dựa vào nước cất trong 72 giờ, và dung dịch được làm đông khô sau đó (máy làm đông khô bằng chân không Labconco).

Mô tả đặc tính của mức độ khử axetyl hóa (DD) bằng cách chuẩn độ điện thế

Chuẩn độ điện thế được sử dụng để xác định mức độ khử axetyl hóa (DD) của Glu-chitosan và biotin-chitosan. Ngắn gọn, 0,2g mỗi chitosan được liên hợp hòa tan vào trong 30ml axit clohidric 0,1M. Sau 2 giờ khuấy liên tục, 25ml nước khử ion đã được thêm vào mỗi dung dịch polyme và khuấy tiếp tục thêm 1 giờ. Khi polyme kết hợp được hòa tan hoàn toàn, dung dịch được chuẩn độ với dung dịch natri hydroxit 0,1M. Từ việc chuẩn độ dung dịch này, đường cong với hai điểm uốn cong thu được. Lượng axit được dùng giữa hai điểm này được coi là tương ứng với lượng nhóm amino tự do trong dung dịch (Tolaimate, 2000). Việc chuẩn độ được thực hiện với bộ đo pH (dụng cụ EUTECH).

Điều chế hạt nano chitosan-ARN

Chế phẩm với tỷ lệ khối lượng chitosan/ARN khác nhau đã được điều chế bằng phương pháp tự lắp ráp trong khi vẫn giữ lượng ARN (ssARN hoặc là dsARN) không đổi (20 µg/mL). Thứ nhất, chitosan được điều chế ở nồng độ 1 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M (pH 4,6). Dung dịch hoạt động với nồng độ 0,08-0,8 mg/ml đã được làm từ nguyên liệu gốc bằng cách pha loãng với cùng một dung dịch đệm. Thể tích tương đương của dung dịch ssARN hoặc dsARN virus (0,04 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M) và dung dịch chitosan được trộn nhanh chóng dưới độ lắc mạnh trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại RT. Hạt nano được lắp ráp đã được sử dụng mà không cần tiếp tục làm sạch. Vì nồng độ ARN không đổi đối với tất cả dung dịch hạt nano, thao tác với nồng độ chitosan thay đổi tỷ lệ khối lượng polyme/ARN.

Sự lây nhiễm virus ở tôm

Động vật

Tôm thẻ chân trắng, *Penaeus vannamei*, khoảng 2 gam mỗi con được cung cấp bởi GN, Phang Nga, SyAqua Siam Co., Ltd. tổng số 1.000 con tôm được làm thích nghi với môi trường ở hồ 3 tấn tại độ mặn 30 ppt trong 5 ngày trước khi thử nghiệm. Tôm được cho ăn với chế độ ăn thương mại là 5% trọng lượng cơ thể. Oxy hòa tan (DO) được duy trì ở mức hơn 4 ppm và nước được đổi khi cần thiết.

Thiết kế thử nghiệm

Bốn phương pháp xử lý đã được kiểm tra (dưới đây) và hai nhóm đối chứng, một đối chứng dương - tiếp xúc với virus sau khi tiêm 1% NaCl và một đối chứng âm (không

tiếp xúc với virus). Vì vậy, tôm chưa trưởng thành được chia thành 5 nhóm mỗi nhóm trong 4 lần lặp lại của 20 cá thể trong các bồn chứa 60-L.

Phương pháp xử lý 1: tiêm đoạn VP28 250bp tự do (không được tạo phức hợp)

Phương pháp xử lý 2: tiêm đoạn VP28 125bp tự do (không được tạo phức hợp)

Phương pháp xử lý 3: tiêm đoạn Glu-Cs/VP28 250bp tự do.

Phương pháp xử lý 4: tiêm hỗn hợp tự do (không được tạo phức hợp) của ba đoạn 250bp gồm 4 gen WSSV (trình tự hiển thị bên dưới).

Tiếp xúc với bệnh

Tôm chưa trưởng thành (kích thước 2g) được tiếp xúc với WSSV bằng cách mỗi loại gây nhiễm trong 24 bồn chứa 60-L. 48 giờ sau khi cung cấp phương pháp xử lý, phần cơ bị nhiễm WSSV được cắt nhỏ ($\approx 10^7$ phiên bản WSSV mỗi 1 gam cơ) được áp dụng dựa trên 5% trọng lượng cơ thể mỗi con tôm tại 48 giờ và 65 giờ sau khi tiêm (tổng số, 10% BW của tôm bị nhiễm). Đối chứng âm và dương đã được tiêm dung dịch muối (2% NaCl) với liều tương tự như phương pháp xử lý. Các nhóm đã được phân tách khỏi đối chứng để tránh bị lây nhiễm.

Tôm được cho ăn liên tục với thức ăn thương mại trong thời gian thử nghiệm tiếp xúc ở BW 5% mỗi ngày. Số tôm được ghi nhận vào buổi sáng (8:00) và buổi chiều (16:00), khi ghi nhận tôm gần chết. Số tôm gần chết và khỏe mạnh đã được lấy mẫu để qPCR và cố định để phân tích mô bệnh học.

Oxy hòa tan (DO) được duy trì ở mức hơn 4 ppm, nhiệt độ luôn thấp hơn 28°C và nước được đổi khi cần thiết.

Phân tích khả năng sống sót phân tích thời gian cho đến thời điểm chết, trong khoảng thời gian đáng kể, giữa 4 phương pháp xử lý khác nhau. Giá trị sống sót trung bình từ các nhóm khác nhau được so sánh bằng ANOVA. Tất cả phương pháp thống kê được xử lý bằng cách sử dụng chương trình R.

Phát hiện WSSV

ADN được phân lập từ mẫu tôm sử dụng Kit nhỏ tách chiết AND bộ gen mô FavorPrep™ (Favorgen Biotech, Đài Loan) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Virus gây bệnh đốm trắng (WSSV) được đặt vào PCR được thực hiện dựa trên phương

pháp của Lo C.F (Lo và cộng sự, 1996). Điện di gel được thực hiện dựa trên phương pháp của Sambrook, 2001 (Sambrook và Russell, 2001).

Kết quả

Lựa chọn trình tự nhắm trúng đích virus

Đích để làm cạm gen WSSV được chọn từ đích WSSV được mô tả trước đó từ tài liệu tham khảo (Kumar và cộng sự, năm 2015). Những đích này bao gồm protein capsid như VP28, ribonucleotide reductases và ARN polymeaza.

Sự tiêm trình tự ARN cạm do virus tiềm năng và theo dõi những thay đổi sau đó trong biểu hiện ở virus và/hoặc lượng tải virus ở tôm là biểu thị gen virus dễ bị tổn thương với việc làm cạm với ARN virus. Mối tương quan với những thay đổi trong lượng tải virus, triệu chứng hoặc tính nhạy cảm với sự lây nhiễm virus ở tôm được xử lý có thể cũng cung cấp tiêu chí quan trọng trong lựa chọn gen đích liên quan cao đến sự lây nhiễm và bệnh lý ở bệnh do virus của động vật giáp xác.

Bảo vệ tôm chống lại WSSV bằng cách tiêm trình tự VP28 và phức hợp H55-VP28

Trong các thử nghiệm trước đó, cho thấy rằng việc tiêm phức hợp sợi đơn và đôi trong hạt nano trên cơ sở chitosan N-axetyl hóa có thể có tác dụng làm cạm sự biểu hiện gen ở tôm.

Để kiểm tra tác dụng của các trình tự dsARN và các phức hợp dsARN trong việc bảo vệ tôm chống virus WSSV, bốn loại phương pháp xử lý đã được điều chế:

1. VP28 250bp dsARN (SEQ ID NO: 59)
2. VP28 125bp dsARN (SEQ ID NO: 64)
3. Phức hợp axit glucuronic-chitosan (Glu-Cs)/VP28 250bp.
4. Hỗn hợp của ba trình tự bao gồm bốn gen WSSV: VP28, VP19, (VP19+VP28-SEQ ID NO: 77), rr2 (SEQ ID NO: 78) và Wsv477 (SEQ ID NO: 79).

Mỗi lần điều trị được cung cấp bằng cách tiêm tới bốn lần lặp lại ở 20 con tôm mỗi lần đã được mô tả trong phương pháp trên, 48 giờ trước khi tiếp xúc tôm với virus. Tôm từ các nhóm (phương pháp xử lý) khác nhau được tính riêng lẻ, và ghi lại hàng ngày.

Số tôm sống sót được ghi lại trong 14 ngày sau khi gây nhiễm (dpi), như thể hiện

trong bảng 6. Con vật bắt đầu chết ở ngày 2 sau khi gây nhiễm trong nhóm đối chứng dương WSSV và tiếp tục chết ở mức trung bình là 4-6 con/ngày. Mô hình tỷ lệ tử vong là rất giống nhau trong tất cả các lần lặp lại trong phương pháp xử lý này. Tỷ lệ chết một trăm phần trăm được quan sát sau ngày 7 sau khi gây nhiễm. Không có số bị chết được quan sát trong nhóm đối chứng âm (bảng 6, FIG.16). Cả ba phương pháp xử lý đã khác đáng kể so với đối chứng dương và phương pháp xử lý 3 (Glu-chitosan-VP28dsARN 250bp) và 4 (hỗn hợp của ba trình tự bao gồm bốn gen WSSV: VP28, VP19, rr2 và wsv477) đã không khác nhau đáng kể so với đối chứng âm, thể hiện hiệu quả tốt nhất.

Bảng 6: ARN nhấm trúng đích Chitosan-virut và khả năng sống sót của tôm khi nhiễm WSSV

Ngày sau khi nhiễm WSSV		0 dpi	1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	13 dpi	14 dpi		
Ngày sau khi tiêm dsARN		Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7	Ngày 8	Ngày 9	Ngày 10	Ngày 11	Ngày 12	Ngày 13	Ngày 14	Ngày 15	Ngày 16
Bể chứa	Phương pháp xử lý																	
1	Âm tính-1	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
2	Âm tính-2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
3	Âm tính-3	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
4	Âm tính-4	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
5	Dương tính-1	20	20	20	20	14	9	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Dương tính-2	20	20	20	20	15	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Dương tính-3	20	20	20	20	17	15	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Dương tính-4	20	20	20	20	17	10	6	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Phương pháp xử lý 1-1	20	20	20	20	20	20	19	19	19	18	18	18	18	18	18	18	18
10	Phương pháp xử lý 1-2	20	20	20	20	20	20	20	19	19	18	18	18	17	17	17	17	17
11	Phương pháp xử lý 1-3	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19
12	Phương pháp xử lý 1-4	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
13	Phương pháp xử lý 2-1	20	20	20	20	20	19	17	15	15	10	10	10	10	10	10	10	10
14	Phương pháp xử lý 2-2	20	20	20	20	19	19	17	17	17	17	17	17	16	16	16	16	16
15	Phương pháp xử lý 2-3	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
16	Phương pháp xử lý 2-4	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	18	18	18	18	18
17	Phương pháp xử lý 3-1	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19
18	Phương pháp xử lý 3-2	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	18	18	18	18	18	18	18
19	Phương pháp xử lý 3-3	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
20	Phương pháp xử lý 3-4	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Phát hiện WSSV

Mức độ lây nhiễm WSSV được đánh giá trong phần phụ bụng và phần mang từ tôm gần chết và khỏe mạnh trong phương pháp xử lý được lựa chọn sử dụng phương pháp phát hiện PCR (FIG.17 và Bảng 7). Thấy rằng tại 4 ngày sau khi gây nhiễm (dpi), không có WSSV đã được phát hiện trong bất kỳ con vật được xử lý ARN nào hoặc đối chứng âm nhưng phát hiện nhiều trong đối chứng dương (không có hạt nano chitosan-ARN, có gây nhiễm WSSV). Tại ngày 7 sau khi gây nhiễm, WSSV đã được phát hiện bằng phương pháp PCR ở một trong hai mẫu và hai trong số ba mẫu điều trị 1 và điều trị 2, tương ứng. Trong khi không có nhu cầu thúc đẩy một giả thuyết duy nhất, một khả năng là trong một số tôm gần chết thì mức độ WSSV là dưới ngưỡng phát hiện hoặc, theo cách khác, rằng nguyên nhân tử vong là khác với WSSV.

WSSV không được phát hiện trong tất cả các mẫu từ con vật khỏe mạnh của tất cả phương pháp xử lý dsARN và trong đối chứng âm ở đầu đó trong kiểm tra (14 dpi). Vì nó là không chắc rằng bị lây nhiễm tiềm ẩn đã đi không bị phát hiện quá lâu sau khi tiếp xúc ban đầu với virus, điều này cho thấy rằng tác dụng bảo vệ của việc cung cấp hạt nano chitosan-ARN vẫn còn ít nhất 17 sau khi xử lý, và việc gây nhiễm virus này đã được phòng ngừa hoặc loại bỏ thành công từ mô của tôm đã xử lý.

WSSV được đặt vào PCR

Bảng 7: Tóm tắt sự phát hiện WSSV được đặt vào PCR

Dòng	Thời gian	Số phản ứng	Chi tiết mẫu	Kết quả
(M)			Thang chuẩn 100bp ADN	
Neg	4 dpi	1	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ đối chứng âm	Không thể phát hiện
T1		2	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ Trt-1	Không thể phát hiện
T2		3	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ Trt-2	Không thể phát hiện
T3		4	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ Trt-3	Không thể phát hiện
Pos		5	Hỗn hợp 4 cá thể bị chết từ đối chứng dương	Có thể phát hiện
T11	7 dpi	6	Tôm bị chết từ Trt-1	Có thể phát hiện

T12		7	Tôm bị chết từ Trt-1	Không thể phát hiện
T21		8	Tôm bị chết từ Trt-2	Có thể phát hiện
T22		9	Tôm bị chết từ Trt-2	Không thể phát hiện
T23		10	Tôm bị chết từ Trt-2	Có thể phát hiện
T1	14 dpi	14	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ Trt-1	Không thể phát hiện
T2		15	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ Trt-2	Không thể phát hiện
T3		16	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ Trt-3	Không thể phát hiện
Neg		17	Hỗn hợp 4 cá thể khỏe mạnh từ đối chứng âm	Không thể phát hiện
P			Đối chứng dương để PCR	Có thể phát hiện
N			Đối chứng âm để PCR	Không thể phát hiện

Ví dụ VII – Làm câm gen với hạt nano chitosan-ARN

Hiệu quả của hạt nano chitosan-ARN bao gồm trình tự gen virus được phân phối qua đường miệng để làm câm gen virus trong tôm đã được nghiên cứu.

Phương pháp

Nhắm trúng đích gen virus

Các trình tự ss và dsARN đặc hiệu với WSSV được điều chế cho các thử nghiệm thách thức WSSV để kiểm tra hiệu quả của trình tự ARN và hạt nano chitosan-ARN trong việc bảo vệ tôm chống lại bệnh do virus WSSV.

Tạo ra ARN

VP28 250bp dsARN (SEQ ID NO: 59) và các đoạn ssARN có nghĩa (SEQ ID NO: 64) và đối nghĩa (SEQ ID NO: 65) VP125 bazơ, đoạn RR2 và Wsv477 được tổng hợp như mô tả trên đây.

Điều chế hạt nano chitosan-ARN

Chế phẩm với tỷ lệ khối lượng chitosan/ARN khác nhau đã được điều chế bằng phương pháp tự lắp ráp trong khi vẫn giữ lượng ARN (ssARN hoặc dsARN) không đổi (20 µg/mL). Thứ nhất, chitosan được điều chế ở nồng độ 1 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M (pH 4,6). Dung dịch hoạt động với nồng độ 0,08-0,8 mg/ml đã được làm từ phần trữ lượng bằng cách pha loãng với cùng một dung dịch đệm. Thể tích tương đương của dung dịch ssARN hoặc dsARN virus (0,04 mg/ml trong dung dịch đệm natri axetat 0,2M) và dung dịch chitosan được trộn nhanh chóng dưới độ lắc mạnh trong 30 giây và ủ trong 1 giờ tại RT. Hạt nano được lắp ráp đã được sử dụng mà không cần tiếp tục làm sạch. Vì nồng độ ARN không đổi đối với tất cả dung dịch hạt nano, thao tác với nồng độ chitosan thay đổi tỷ lệ khối lượng polyme/ARN.

Sự lây nhiễm virus ở tôm

Động vật

Tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*), khối lượng khoảng 2 gam, được cung cấp bởi GN, Phang Nga, SyAqua Siam Co., Ltd. Tổng số 1.000 con tôm được làm thích nghi với môi trường ở hồ 3 tấn tại độ mặn 30 ppt trong 5 ngày trước khi thử nghiệm. Chúng được cho ăn với chế độ ăn thương mại là 5% trọng lượng cơ thể Oxy hòa tan (DO) được duy trì ở mức hơn 4 ppm và nước được đổi khi cần thiết.

Thiết kế thử nghiệm

Bốn phương pháp xử lý được kiểm tra và hai nhóm đối chứng, một đối chứng âm và một đối chứng dương được sử dụng. Vì vậy, tôm chưa trưởng thành được chia thành 6 nhóm mỗi nhóm trong 4 lần lặp lại của 20 cá thể trong các bồn chứa 60-L (tổng = 28 bể chứa).

Đặc tính về kích thước hạt nano

Kích thước hạt của hạt nano chitosan/ARN virus được xác định như trong ví dụ V.

Lưu giữ và giải phóng ARN

Sau khi tạo ra hạt nano, việc lưu giữ ARN được đánh giá bởi điện di gel như mô tả trong ví dụ V.

Thu thập mẫu, tách chiết ARN và tổng hợp cADN

Thu thập mẫu, tách chiết ARN, tổng hợp cADN và RT PCR được thực hiện như trong ví dụ V, sử dụng mỗi cụ thể cho từng gen. Trình tự mỗi được lựa chọn để PCR trong biểu hiện gen của virus được thiết kế sử dụng thử nghiệm qPCR thời gian thực (IDT). Giá trị Ct delta trung bình $\pm$ SD được xác định cho mỗi lần xử lý, và quá trình định lượng liên quan đến đối chứng không được xử lý thiết lập về 1.

Điều chế thức ăn cho tôm

Thức ăn nuôi tôm gồm các hạt nano ARN làm câm gen virus hoặc chitosan-ARN được điều chế như trong ví dụ V, bao gồm điều chế các phương pháp xử lý hạt nano khác nhau, pha trộn bằng cách lắc, làm đông khô và pha trộn phức hợp chitosan-ARN đông khô với thức ăn tôm và cuối cùng làm khô hỗn hợp.

Phân phối qua đường miệng của ARN nhắm trúng đích virus ở tôm sử dụng hạt nano trên cơ sở chitosan được khử axety hóa.

Tôm vị chưa trưởng thành (ví dụ như *Peneaus vanameii* sáu tuần tuổi) được chia thành các nhóm giữ tách biệt trong suốt thời gian thử nghiệm câm gen. Để đánh giá sự làm câm gen virus trong tôm bị lây nhiễm, tôm được tiếp xúc với virus, sự lây nhiễm được xác nhận trong tôm và được phép tiến hành lên đến một mức độ định trước của sự lây nhiễm virus ở tế bào, và sau đó cho ăn thức ăn thử nghiệm. Để đánh giá những khía cạnh phòng ngừa câm gen virus trên sự lây nhiễm virus ở tôm, tôm được cho ăn thức ăn thử nghiệm trước hoặc đồng thời với việc tiếp xúc với virus, và mức độ lây nhiễm virus cũng như biểu hiện gen đích trong tôm bị lây nhiễm, và mối tương quan giữa hai điều này có thể làm sáng tỏ tính hiệu quả của việc cho ăn ARN làm câm gen virus để phòng ngừa hoặc làm giảm sự lây nhiễm virus ở động vật giáp xác.

Tôm được cho ăn với hạt thức ăn thương mại, bao gồm ở một số nhóm, hạt được điều chế với trình tự làm câm gen virus tự do (ds, có nghĩa và đối nghĩa, hỗn hợp đối chứng có nghĩa và đối nghĩa và không có nghĩa), và nhóm khác của tôm tiếp nhận hạt được trộn với hạt nano được tạo phức hợp với dẫn xuất chitosan/ARN. Trình tự ARN virus được tạo phức hợp với chitosan được cung cấp trong các viên chứa các phức hợp trên cơ sở H35(DD=35%), H42(DD=42%), H55(DD=55%) hoặc chitosan không được xử lý (DD=83%). Một cách tùy chọn, ARN được tạo phức hợp với chitosan bao gồm hạt nano chitosan-ARN được liên hợp với axit glucuronic. Chế độ cho ăn ví dụ là hai lần mỗi ngày trong 5 ngày tương ứng với 5% trọng lượng cơ thể. Đo biểu hiện gen

virut được thực hiện trên phần mang được cắt ra và được bảo quản cho đến khi sử dụng bằng cách ngâm ngay lập tức trong nitơ lỏng.

Kết quả

Lựa chọn trình tự nhắm trúng đích virut

Trình tự ARN làm câm gen virut tiềm năng (ví dụ như VP28, VP19, Rr2, Wsv477), trình tự, vỏ protein và trình tự liên quan đến vỏ protein, trình tự ARN-polymeaza, trình tự protein màng bao, trình tự cần thiết để truyền virut) có thể được sàng lọc đối với hiệu quả trước khi thử nghiệm cho ăn, ví dụ, bằng cách tiêm hạt nano chitosan-ARN và giám sát những thay đổi tiếp theo trong biểu hiện virut và/hoặc lượng tải virut trong tôm là biểu hiện gen virut có khả năng dễ bị tổn thương để làm câm với ARN virut. Mỗi tương quan với những thay đổi trong lượng tải virut, triệu chứng hoặc tính nhạy cảm với sự lây nhiễm virut trong tôm được xử lý có thể cũng cung cấp cho tiêu chí quan trọng trong lựa chọn gen đích liên quan cao đến sự lây nhiễm và bệnh lý ở bệnh do virut của động vật giáp xác. Một trong những thử nghiệm này, với virut WSS, được mô tả ở trên (Ví dụ VI).

Khả năng tạo phức để bảo vệ ARN virut khỏi việc phân hủy enzym:

Khả năng của phức hợp chitosan-ARN để giảm thiểu, hoặc thậm chí loại bỏ sự sẵn có của các ARN tạo phức đối với thoái hóa RNaza có thể được chỉ định bằng cách giám sát sự thoái hóa RNaza của trình tự làm câm gen virut tiềm năng “trần” (tự do), so với các trình tự tương tự khi tạo phức trong các hạt nano-ARN chitosan hoặc dẫn xuất chitosan, trong sự kết hợp khác nhau của chitosan: tỷ lệ khối lượng ARN và mức độ khử axetyl hóa của dẫn xuất chitosan.

Làm câm gen *in vivo* bằng cách cho ăn các hạt nano chitosan-ARN virut.

Trong các thử nghiệm trước đó, cho thấy rằng việc tiêm phức hợp sợi đơn và đôi trong hạt nano trên cơ sở chitosan N-axetyl hóa có thể có tác dụng làm câm sự biểu hiện gen ở tôm. Để kiểm tra xem phân phối trình tự ARN làm câm gen virut thông qua đường ăn của hạt nano được tạo phức hợp với chitosan-ARN virut này có thể hiệu quả trong việc kích hoạt ARNi và làm câm gen virut *in vivo*, Tôm (ví dụ như *Penaeus vannamei* chưa trưởng thành) được cho ăn với hạt nano được tạo phức hợp với chitosan-ARN virut (các dẫn xuất H35 (DD = 35%), H42 (DD = 42%), H55 (DD = 55%) hoặc phức hợp trên

cơ sở chitosan không được xử lý (DD = 83%) trộn trong thức ăn, với đối chứng của hạt thức ăn chứa ARN virus tự do chứa và thức ăn thương mại (thức ăn đơn giản, không bổ sung ARN) theo một chế độ và liều định trước (ví dụ như hai lần một ngày trong 5 ngày với tổng liều hàng ngày là 5% sinh khối của tôm). Quần thể mẫu tôm bao gồm tôm chưa thử nghiệm (không bị lây nhiễm bởi virus) và tôm bị lây nhiễm (nhiễm virus được xác minh bằng cách lấy mẫu hàm lượng virus trước khi bắt đầu cho ăn).

Một nhóm bổ sung có thể được thêm vào, bao gồm tôm được tiếp xúc với virus *trong suốt* quá trình cung cấp hạt nano, để theo dõi tác dụng của việc cho ăn hạt nano trên độ nhạy cảm với sự lây nhiễm virus.

Tại một thời điểm xác định trước sau khi cho ăn lần cuối cùng (ví dụ 48 giờ), tôm được làm chết và tổng ARN được chiết xuất từ mô tôm để phân tích PCR định lượng thời gian thực, cũng như phân tích hàm lượng virus trong các nhóm khác nhau. Ảnh hưởng (ví dụ như giảm) trên biểu hiện mRNA virus liên quan trong tôm là vì vậy biểu hiện tính hiệu quả của chế phẩm hạt nano chitosan - ARN virus khác nhau (ví dụ như tỷ lệ khối lượng, mức độ khử axetyl hóa của chitosan), trình tự virus cụ thể, liều lượng và chế độ xử lý để làm câm gen virus *in vivo* bằng cách cho ăn hạt nano chitosan - ARN virus.

Tăng cường khả năng sống sót bằng cách cho ăn các hạt nano chitosan-ARN virus.

Ngoài việc làm câm gen bằng cách tiêu hóa ARN sợi đơn và đôi được tạo phức hợp trong các hạt nano trên cơ sở chitosan N axetyl hóa một phần, hoặc trong hạt nano biotin - hoặc glu-chitosan-ARN, là tiêu chuẩn để biết sau cùng thì câm gen làm cải thiện sức đề kháng, hoặc khả năng chống chịu bệnh của tôm, cụ thể, đối với bệnh do virus. Để kiểm tra xem việc phân phối trình tự ARN làm câm gen virus thông qua đường ăn hạt nano tạo phức chitosan-ARN virus như vậy có thể làm giảm hiệu quả mức độ lây nhiễm hoặc cải thiện sự sống sót của tôm sau khi tiếp xúc với virus gây bệnh, tôm (ví dụ như *Penaeus vannamei* chưa trưởng thành) được cho ăn với hạt nano tạo phức chitosan-ARN virus (dẫn xuất H35 (DD = 35%), H42 (DD = 42%), H55 (DD = 55%) hoặc phức hợp trên cơ sở chitosan không được xử lý (DD = 83%), với đối chứng của hạt thức ăn chứa ARN virus tự do và thực phẩm thương mại (thức ăn đơn giản, mà không bổ sung ARN) theo một chế độ và liều định trước (ví dụ như hai lần một ngày trong 5 ngày với tổng liều hàng ngày là 5% sinh khối của tôm). Quần thể mẫu tôm bao gồm tôm chưa thử

nghiệm (không bị lây nhiễm bởi virus) và tôm bị lây nhiễm (nhiễm virus được xác minh bằng cách lấy mẫu hàm lượng virus trước khi bắt đầu cho ăn).

Một nhóm bổ sung có thể được thêm vào, bao gồm tôm được tiếp xúc với virus *trong suốt* quá trình cung cấp hạt nano, để theo dõi tác dụng của việc cho ăn hạt nano trên độ nhạy cảm với sự lây nhiễm virus.

Tại thời điểm định trước (hay một số thời điểm) sau khi bắt đầu cho ăn (ví dụ, 48 giờ, 4 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 6 tháng), tôm được đếm và kiểm tra xem có ảnh hưởng về tốc độ tăng trưởng, trọng lượng (sinh khối), kiểm tra xem có biểu hiện khỏe mạnh và bệnh lý, bị làm chết, hàm lượng virus được xác định và tổng ARN được chiết xuất từ mô tôm để phân tích PCR định lượng thời gian thực. Ảnh hưởng (ví dụ như giảm) trên tỷ lệ nhiễm virus và hàm lượng virus trong tôm bị lây nhiễm, và trên các thông số sức khỏe khác nhau (trọng lượng, tốc độ tăng trưởng, biểu hiện, nguồn cấp dữ liệu chuyển đổi, tồn tại, v.v.) đang theo dõi, và sau đó có thể được tương quan với các hiệu ứng cho ăn các hạt nano ngày tương đối viral mRNA biểu hiện, cung cấp một biện pháp của những lợi thế thực sự để tôm nuôi trồng thủy sản cho ăn hạt nano, cụ thể hơn, chế phẩm chitosan-ARN virus khác nhau (ví dụ như tỷ lệ khối lượng, mức độ khử axetyl hóa chitosan), trình tự virus cụ thể, liều lượng và chế độ xử lý làm câm gen virus *in vivo* bằng cách cho ăn hạt nano chitosan-ARN virus.

Tóm lại, kết quả như vậy có thể cung cấp các hướng dẫn quan trọng để lựa chọn đích gen virus có hiệu quả và trình tự ARN làm câm gen virus, cũng như của các phương pháp hiệu quả cho việc điều chế và cung cấp trình tự ARN làm câm gen virus, như hạt nano chitosan - ARN virus, đến tôm thông qua việc ăn thức ăn, và ảnh hưởng của nó trên sức đề kháng và khoảng chống chịu đối với bệnh do virus và khả năng nâng cao sự sống sót của tôm khi đối mặt tiếp xúc với virus gây bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hạt nano chitosan-ARN bao gồm chitosan được khử axetyl hóa một phần và ít nhất một trình tự ARN có chiều dài ít nhất là 50 bazơ, trong đó mức độ khử axetyl hóa của chitosan nằm trong khoảng từ 35% đến 42% và trong đó trình tự ARN có thể làm câm sự biểu hiện của gen khi sử dụng cho sinh vật biểu hiện gen này.
2. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó mức độ khử axetyl hóa của chitosan là 35%.
3. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó ít nhất một ARN oligonucleotit là ARN sợi đơn (ssARN).
4. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó ít nhất một ARN oligonucleotit là ARN sợi kép (dsARN).
5. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 2, trong đó ít nhất một ARN oligonucleotit là ARN sợi kép (dsARN).
6. Dược thực phẩm bao gồm thức ăn cho động vật giáp xác được nuôi và hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1.
7. Động vật giáp xác được nuôi chứa hạt nano theo điểm 1.
8. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó ít nhất một trình tự ARN chứa một hoặc nhiều thành phần sau:
 - (a) ít nhất một trình tự có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi;
 - (b) ít nhất một trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi;
 - (c) ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi;
 - (d) ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi;
 - (e) ít nhất một trình tự có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi;
 - (f) ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liên kề của phân tử mARN đích

của động vật giáp xác được nuôi, và

(g) ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần với phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi.

9. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó trình tự bổ trợ một phần hoặc trình tự có khả năng liên kết thông qua bazơ bổ trợ bắt cặp với phân tử axit nucleic đích của ít nhất một trình tự ARN bổ trợ với trình tự của phân tử axit nucleic đích có chiều dài ít nhất 50, ít nhất 75, ít nhất 100, ít nhất 150, ít nhất 200, ít nhất 250, ít nhất 400, ít nhất 500, ít nhất 600 và ít nhất là 750 bazơ.

10. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó ít nhất một trình tự ARN chứa ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 21 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi tương đồng với ít nhất 50, ít nhất 75, ít nhất 100, ít nhất 150, ít nhất 200, ít nhất 250, ít nhất 400, ít nhất 500, ít nhất 600 và ít nhất là 750 bazơ của phân tử mARN đích.

11. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó ARN này bao gồm ít nhất một trình tự có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi hoặc bao gồm ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi bao gồm:

(a) trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 5, hoặc

(b) trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59, 64, 77, 78 và 79.

12. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó ARN bao gồm ít nhất một trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi hoặc ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liên kề của phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi bao gồm:

(a) trình tự axit nucleic tương đồng với ít nhất 21 bazơ liên kề của trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 5, hoặc

(b) trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59, 64, 77, 78 và 79.

13. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó phân tử mARN đích của động vật giáp xác được nuôi bao gồm trình tự Rab7 mARN hoặc các đoạn của nó.
14. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 13, trong đó hạt nano chitosan-ARN này bao gồm trình tự ARN được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 47, 53, 54.
15. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, bao gồm ít nhất một trình tự ARN bổ sung có khả năng định hướng sự phân cắt của phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi.
16. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 15, trong đó ít nhất một trình tự ARN và ít nhất một trình tự ARN bổ sung được định hướng đến mARN đích của cùng một virus.
17. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 15, trong đó ít nhất một trình tự ARN và ít nhất một trình tự ARN bổ sung được định hướng đến mARN đích của các virus khác nhau.
18. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó kích thước hạt của hạt nano nằm trong khoảng từ 50 đến 500nm, như được đo bằng đường kính trung bình z hiệu quả.
19. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó chitosan này được liên hợp với phân tử được chọn từ nhóm bao gồm biotin, axit glucuronic và polyme.
20. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 1, trong đó kích thước hạt của hạt nano nằm trong khoảng từ 100 đến 200nm, như được đo bằng đường kính trung bình z hiệu quả.
21. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó ARN này chứa ít nhất một trình tự có khả năng liên kết thông qua sự bắt cặp bazơ bổ trợ với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi hoặc chứa ít nhất một trình tự bổ trợ ít nhất một phần với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi bao gồm:
 - (a) trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 5, hoặc
 - (b) trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59, 64, 77, 78 và 79,
 và trong đó mức độ khử axetyl hóa của chitosan là 35%.
22. Hạt nano chitosan-ARN theo điểm 8, trong đó ARN này bao gồm ít nhất một trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với phân tử mARN đích của virus gây bệnh ở

động vật giáp xác được nuôi hoặc ít nhất một trình tự tương đồng với ít nhất 20 bazơ liền kề của phân tử mRNA đích của virus gây bệnh ở động vật giáp xác được nuôi bao gồm:

(a) trình tự axit nucleic tương đồng với ít nhất 21 bazơ liền kề của trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1, 2, 3 và 5, hoặc

(b) trình tự axit nucleic bổ trợ với trình tự axit nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 59, 64, 77, 78 và 79,

và trong đó mức độ khử axetyl hóa của chitosan là 35%.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ViAqua Therapeutics Ltd.
 UFAZ, Shai
 EINBINDER, Shai
 BALTER, Adi
 SCHROEDER, Avraham
 TSROR, Chen

<120> HẠT NANO CHITOSAN-ARN VÀ DƯỢC THỰC PHẨM CHỨA HẠT NANO NÀY

<130> 69157

<150> US 62/327,605
 <151> 2016-04-26

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 615
 <212> ADN
 <213> virut gây bệnh đốm trắng

<400> 1
 atggatcttt ctttcactct ttcggtcgtg tcggccatcc tcgccatcac tgctgtgatt 60
 gctgtattta ttgtgatttt taggtatcac aacactgtga ccaagaccat cgaaaccac 120
 acagacaata tcgagacaaa catggatgaa aacctccgca ttctgtgac tgctgaggtt 180
 ggatcaggct acttcaagat gactgatgtg tcctttgaca gcgacacctt gggcaaaatc 240
 aagatccgca atggaaagtc tgatgcacag atgaaggaag aagatgcgga tcttgtcatc 300
 actcccgtgg agggccgagc actcgaagtg actgtggggc agaatctcac ctttgaggga 360
 acattcaagg tgtggaacaa cacatcaaga aagatcaaca tcaactggtat gcagatgggtg 420
 ccaaagatta acccatcaaa ggcctttgtc ggtagctcca acacctctc cttcaccccc 480
 gtctctattg atgaggatga agttggcacc tttgtgtgtg gtaccacctt tggcgcacca 540
 attgcagcta ccgccggtgg aaatcttttc gacatgtacg tgcacgtcac ctactctggc 600
 actgagaccg agtaa 615

<210> 2
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> virut gây bệnh đốm trắng

<400> 2
 tgacgtacct cttcatcaaa cagaaaaaaaa atggccacca cgactaacac tcttcctttc 60
 ggcaggaccg gagcccaggc cgctggccct tcttacacca tggaagatct tgaaggctcc 120
 atgtctatgg ctgcgatggg tctctttttg atogttgcta tctcaattgg tatectcgtc 180
 ctggccgtca tgaatgtatg gatgggacca aagaaggaca gcgattctga cactgataag 240
 gacaccgatg atgatgacga cactgccaac gataacgatg atgaggacaa atataagaac 300
 aggaccaggg atatgatgct tctggctggg tccgctcttc tgttcctcgt ttccgccgcc 360
 accgttttta tgtcttacct caagaggagg cagtaaaaat ataaaaa 407

<210> 3
 <211> 1242
 <212> ADN
 <213> virut gây bệnh đốm trắng

<400> 3
 atggagtc aa tcaaactgtt caccgttgct ggtctgaata tggagcaagc caaccaagtg 60
 gctgaagaaa tcaagtcaga atataaaacc gaggaggaaa agaggattgc ccaggaagtg 120
 tttgacaaat tcaccaaaaa actcattatg caagtagata cgtttaaaca cttacttaca 180
 agagaaaacc ccaaccgttt tgtatccgcg cccattgtcc atgaagatct ctgggaaatg 240
 tacaaaaaag aggttgccctg tttttggaca ttggaagaga ttgatttcga aagggatcct 300
 aaagattggg agaaactcac tcaagatgag aaggatttca ttctccagat tctggcgttc 360
 tttgcatcct ctgacggaat tgtaattgaa aatcttaca cactcttcg tcaagtggcg 420
 cagattccag aagcgaggag tttctttgac ttccaagttg gaatggagag tattcatggc 480
 aacgtctacg gagaactgat tgatagactg gtgcccgcg aaaaagacaa ggctatcttg 540
 tttaacgctg cacaacactt ccccgccatc aagaagaagg agcagtgggc tattaattgg 600
 atgcaaagca ataacgattt ggcggaacta attgttgccct ttgctgcagt tgaaggaatc 660
 ttcttttagtg gtgcattcgc atccattttc tggatcaaga acaggggtat tttgcctggt 720
 ctcacctcct ccaatgagtt catttctagg gacgaaggtc ttcatcgca ctttgcattgc 780
 atgctgttga aaaaggggtt tgttgatacc ccatcaagag aaaggattct tgaaattgtc 840
 actgaagccg tccgaattga acaagaattt ctcacagttt ccctgcctgt taaattagtg 900
 ggaatgaact gcaagttgat gagccagtac attgaatttg tggcagataa actattgggt 960
 gaaatgggac tagaaaagca ctataatgtt accaaccct tcccattcat ggacaatatt 1020
 tccctcgaga ataagacca cttttttgaa aagagagtcg ccgagtatca acgtgccag 1080
 gtcattggct ctatcaataa gatcaagaag gaccaacaaa cccaagaaac tggttctcct 1140
 ctcccaattc tgactgcacc tcctccagtc tcttctcat catccgaaca agaagatgtt 1200
 gaagacggcg tcggggacta catcagttat gacgattttt ag 1242

<210> 4
 <211> 790
 <212> ADN
 <213> virut gây bệnh đốm trắng

<400> 4
 ctcatgccgg agaagtgatt gaaggttgta ctacagtttc ttctatcaag gaactaatca 60
 gtgtgttacc agaagttgtg gatgtgattc tcattgacga agggcaattc ttcacggatt 120
 tgggtgctagt caatagactg gctgacaagg ggaaaaggat tgtgattgca gcacttgatg 180
 gaacttctga ccagcaaatg ttcagtcta ttcataagct attgccttat acaaattcca 240
 ttgttaagct agcatctaaa tgtatgattt gtaaaattga taccaaagaa gctcctttta 300
 ctgtaagggt tggtaatgac aatgataata atgttatatg tgtaggagga gctgaaatgt 360
 acgctgctgc ctgccgggac tgttacaaaa aaattaacaa gaaaaagaa aaggggaaac 420
 ttgttggtact tgaaggaggt gacaggtgcg gtaagagtag ccaagccaaa ctcttggtga 480

ccaataaaaa ctcgcctctt tatggaggag aatacatgtg ctttcccgac aggagcagcc 540
 atacgggtaa actcatcaat gattatttaa ctaagaaaat tgaactagat gatcatgcag 600
 ctacttggtt attttctgca aatagatggg aagttttag taaaattaag cagttgttag 660
 acgatggaat ccatgttgtg atggatagat attactactc ggggattggtt ttctctttag 720
 ctagaggagt ggataccgtt gagtgggtgct ctgctagcga tgagggactt cctcagcccg 780
 atcttgtatt 790

<210> 5
 <211> 805
 <212> ADN
 <213> virut gây bệnh đốm trắng

<400> 5
 cggcgggtgga caagaggttg gttgaatctc taaagaaaac tcacaattcc acattcgtaa 60
 ttattttaa at tgggattaga tcgaataatg tatactcttcg tcgaagggtc cccctcaca 120
 ggggaagagtt catggatgtc caagttgata gatacaggat catgtggaat gtctttcctc 180
 aattttcttc gtatgaacac ttctgactac tacaactggc ctgccgaaat cgggacagaa 240
 catctccagt taggtttcag agaaaccaga gtgggtgatg gaatgtttga acctgtccta 300
 aagacctttg tcgactcgtg gaagaaagag caaggaaaag agagtttgaa ggaatatctg 360
 gactacaacg gccaaagtcac ggagatctac atcgcagaat ggttgagaca aaggccacta 420
 gccttcacag tgtttaccta tacagatgaa gctgtcaaga gtggattctt gaacgaggag 480
 gatctagata tggatactgc aaccaagtgg atggctgaaa ttattagaga gaagaggggc 540
 aatattcaag aaataaaagt gaccctaga gtagtcttca atggcaatgg ttgtagtgca 600
 tgtttctcta aactaagag aaacttgat aactttggaa caaactataa caatgttgta 660
 cattgtgatt tgttggtccc ttttgcaagg cataggattg tacatttctt ataatggttt 720
 aaggaacgtg ttttcgagtc ttctttttac aaaataaaac aatatataaa attcaaaaaa 780
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 805

<210> 6
 <211> 615
 <212> ADN
 <213> virut gây bệnh đốm trắng

<400> 6
 atggaatttg gcaacctaac aaacctggac gttgcaatta ttgcaatctt gtccattgca 60
 atcattgctc taatcgttat catgggtata atgattgtat tcaacacacg tgttggaaga 120
 agcgtcgtcg ctaattatga tcagatgatg cgagtcccaa ttcaaagaag ggcaaaggta 180
 atgtcaattc gtggagagag gtcctacaat actcctcttg gaaaggtggc catgaagaat 240
 ggtctctccg ataaggacat gaaggatgtt tctgctgac ttgtcatctc taccgtcaca 300
 gcccaagga ctgatccgcg tggcactggg gcgcagaact ctaacatgac tttgaagatc 360
 ctcaacaaca ctggcgctga tctcttgatc aacgacatta ctgttcggcc aactgttatt 420
 gcaggaaaca ttaagggaaa tactatgtcg aacacttact tctcgagcaa ggacattaaa 480

tcttcatctt caaaaattac cctcattgac gtgtgcagca aatttgaaga cggcgcagcc 540
 ttogaagcta caatgaacat tggattcacc tccaggaatg tgatcgatat caaggacgaa 600
 atcaagaaga agtaa 615

<210> 7
 <211> 1164
 <212> ADN
 <213> Virut gây hội chứng Taura

<400> 7
 tcaaaagata gggatatgac gaaagtcaac gcatatgaga acttacctgg taagggttc 60
 actcatggtg ttggcttcga ttatggcgta cccctgtctc ttttccctaa caatgccatt 120
 gatcccacaa ttgcagtgcc tgaaggattg gatgagatgt ctattgaata cttagcacag 180
 cgaccatata tgctcaacag atacactatc agagggtggtg acactcctga tgcgcatgga 240
 acaattattg cagatattcc agtgagtcc tgcatttta gtttgtatgg taaagttatt 300
 gctaagtatc gcaccctatt cgctgccccg gttagtctag ctgtagcaat ggctaattgg 360
 tggcgtggaa atattaacct taatcttcgc tttgctaaga cgcagtacca tcaatgcaga 420
 ttgctggtgc aatatctccc ctatggtagt ggtgttcaac caatagaaag tatcctttca 480
 cagatcatcg acatctcaca agtcgatgat aagggtattg acattgcttt tccttcgctc 540
 tatcccaata agtggatgag agtgtagcat ccagcgaaag ttgggtacac ggcagattgt 600
 gccccaggcc gaatcgatc ttccgttctc aatccactta tctcagcttc gacagtctct 660
 cctaattattg tcatgtatcc ttgggtgaat tggagcaatt tagagggttg tgaaccagg 720
 acgcttgcta aagcagccat cggcttcaat tatccagcag atgttctctga ggagccact 780
 ttttcagtaa cgcgtgctcc agtatctgga acactgttta cgttactcca ggatacgaag 840
 gtgtcttttg gggaagctga cgggtgattc tcattatact ttacgaacac taccactggt 900
 ggaaggcaca gactagctta tgccggactg cctggtgaac tcggtagttg tgagatagtg 960
 aagctacctc aagggaata ttcaattgaa tacgcagcta ccagcgctcc aactcttgtt 1020
 ctgatagac ctatcttttc tgaaccgatt ggccccaggt atgtagtcac taaagttaag 1080
 aacggtgatg ttgttggtat ttccgaggag acgttagtaa catgtggtag tatggcagcg 1140
 attggtgaag ctacggtcgc attg 1164

<210> 8
 <211> 1274
 <212> ADN
 <213> Virut gây hội chứng Taura

<400> 8
 gttcggattt tcaaaagata gggatatgac gaaagtcaac gcatatgaaa atttacctgg 60
 taagggttc acccatggtg ttggctttga ttatggtgta cccctgtctc ttttcccaaa 120
 caatgccatt gatcccacta ttgcagtgcc cgaaggattg gatgaaatgt ctattgaata 180
 cctagcacia cgaccatata tgctcaacag atacactatc agagggtggtg acaccctga 240
 tgcgcatggc actattatcg cggatattcc agtgagtcct gtttaatttta gcctgtatgg 300

caaagttatt gctaagtatc gcaccctatt cgctgcccc attggtctag cagtagcaat 360
 ggctaattgg tggcgaggta acatcaacct caatcttcgc ttgctaaga cgcagtagca 420
 tcaatgtagg ttgctgggtgc aatatctccc atatggtagt ggtgttcaac cgatagaaag 480
 tatectttca gagattattg acatttcaca agtcgatgat aagggtattg acgtcgcttt 540
 cccttcggtc tatectaata agtggatgag agtgtacgat ccagcgaaag ttggctacac 600
 ggcagattgt gccccaggcc gcacgtcat ttccgttctt aatccactca tttcagcttc 660
 aacagtctct cctaattattg tcatgtatcc ttgggtgact tggagcaatt taggggttgc 720
 tgaaccaggt acgtttgcta aggcagccat tggcttcaac tatccagcgg atgttcccca 780
 ggagccaact ttttcagtga cgcgtgctcc agcgtctgga aactgttta ctgtgctcca 840
 ggatacgaag gtgtcttttg gggaagctga cgggtgtattc tcattatctt ttacgaacac 900
 caccagtgc aaaaaatata aactagcata tgctggcctg cctggtgaac ttggtagtgt 960
 tgaaatagta gagttacctc aagggaata ttcaattgaa tatgcagcta ctacgcccc 1020
 aactcttggt ttaaataagac ctatcttttc tgaaccactt ggccctaagt atgtagttac 1080
 taaagtaaag aatggtgatg ttattagtat atccgaggag acgttagtaa catgtggtaa 1140
 aatgtcagca gttggccaag ctacggttgc attgcgaggc tcagatgcgc caattgaaat 1200
 tttgaaatta gcttcagatt ttgagtcctc agctccagtg aagttcagtc caggtgactt 1260
 taccgtagtc actg 1274

<210> 9

<211> 859

<212> ADN

<213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 9

ctcatgtgact acacatcatt catcagatca caaatcgaac acatcaaaca ccacttctct 60
 atctggctat ttgaggtgat tccaaagatc tccatccaac ctgtagacaa agcactgcgt 120
 tccatcttca tcggccagc cttcatgaac gatgtttacc gctgcttcaa caccgcatgg 180
 ctagaattca ccaaaacacg actttcctac aacactgtcc tcacggatt caaagacaca 240
 cactgtggca tcaacaagct gatcaacggg atcaaggcag gattcaaccc aaaaggcaaa 300
 gccaaatgga tctcgcaaga ctatcccaag tttgacacct gtgttgacac catggcacia 360
 tactottaca tcatgaatca cgcatacac tacactcaca ctaacctctc tottattact 420
 cgtggcctct gtcagctaatt tgcaaactcc accagcccaa tcatctacta caacagcatg 480
 ctcatcagga aactgcatgg ggtgtcaagt ggtgacggcg caacagcaat taagaacagc 540
 cactgtaaca gtatcatcac aaacatcgcc ttctacagac aatcattga caatcaagtg 600
 tccgaagaat accgcggtct acaatccact ctctacaaca cactcatcaa tggcatacaa 660
 agtaaagacg atgcatactc tacacaccgc gctttcgaat ggaacatctc tcgctgtgcc 720
 actottagcg acgacacact tgccatcatc aatccagacg tcttcgatct tgatcaatac 780
 ctttcaagct atcgaactct aggtgggttat gaaatcacta atgagaaaaa gatcttcgtc 840
 cgtgatgagc catatgaat 859

<210> 10
 <211> 2539
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh đầu vàng

 <400> 10
 tctcttgccg cagcgaacg atacatcatc catgctctga gtgtgagaat ggacatcagg 60
 aaaatgtatg tagacaacga cttccgctgc gccagcatc tagacaagga aggttattct 120
 aagatcactg acgacaagaa caacgtcacc atcttttagaa ctaacgcaac ccgttcagaa 180
 cttcctggcg taagcaagat tctcaagcaa gtcgaaaaga aaagcttctt caagatcatc 240
 tatgaattca cactcaagca ctggatccaa cacaacatcc tcctcagttt cattgccgct 300
 cgtgaagaca tgccatctga agtcatcgat ttcaaagtga taaagcaaga cggtgacaag 360
 acttacatca agacagacaa attctttctc ttcaagatca acaacaaata cattgacgct 420
 acaacacttc aagacatttc actcaagcaa gaatacacca atggtaaact ctactatac 480
 atcgatggcg gtatcaagaa gggatatcaag aacatcagaa tcaccactcc taatccttcc 540
 aactctctta ccctctggaa tactatcact cctactacta cagtcctcaa catcttccgt 600
 ggcattcaat tccaagcttc caccttctac attgacaaca ccggaagtct tcttgacaag 660
 atggccaata acaacatcac cgtcattcaa gggccacctg gtaccggtaa gacatacacc 720
 ataaacaaat tccttgcaag aatcaatgaa attctcccta attccaacat tgccgtcctt 780
 gctagctccc actctgcagt tgataacatt ggtaactcag tcaatccctc catcttccgc 840
 agatgcaaga gacttatccc tcaagaatca gaagacaaag tccgtaccag gttccaaaga 900
 tacacaactg gcggtggcat catcttcgct actctccagt caaccctggg tattttatgt 960
 cctagtgtag aatacatgat catcgatgaa ttctcaatgg cactgacat tcaaactctac 1020
 tccgccatct gtcattctca tccacgtcat gtcattctca ctggtgatcc ttgtcaacta 1080
 tccactcaac acgtatacaa cacagacgtt taccattcca acatcatcaa caatcatcag 1140
 ctacaggca agttccctac tgaattcctt gatatcacct atcgcatggg ctcaaagatc 1200
 aatgatttca tctcagaaaa cttctacaac ggtaagctca aaacagccgc tacgtatgaa 1260
 ggtgaggtct tccagctcca cctagacctt atcaacatgc tctcacagat ccattgcaatt 1320
 tgggaatcat cactcagaa caactttgcc attctagtta cacatcatga agcattctcc 1380
 atcatcagac aatatttcac tgaccttgac attcaaattc ccatctacac tgtccacaca 1440
 tcgcaaggca gaacatttga ccgtggaatc gtgcgcagct accgcaacac cgcgttcaca 1500
 aaggatccaa acattgtgaa tgtagccgtc agtcgtttcc gcttccagtg tatctgcatg 1560
 caccagggca atccatacta cgctaaactt ccatactaca acacatcaca aatctacttt 1620
 gagaaatcca ctacagttat cgcatacaat ggaccacaga acaaactctc caacatgtac 1680
 actgacaaca tcaagccatt tccataccac acccttgaaa accgctatca gagtgaaaag 1740
 gcaaagtatc ttggcaagaa attaatcctc cacaacaatc catttgaaac tctcaaagaa 1800
 gccaaagaa tggtcacacg cgaagataac ctcatgagg ccaaagtatc agcagaagta 1860
 atgactcgct tgctgttcga gaaattcaac aatcccgatc tagctaagca tctcatcaac 1920

actggcaaaa gtcatttagt cgaaaacacc aagcatccta tctggggcgg caaagggtgt 1980
 gaaaaccttc acgggaaaat cctcaccaac atccgtacca aattggaagt ccgcgaacgt 2040
 gaacccactc tgatcgacac ttcatacaaa cacaatgtca tcttcacaa attcaagaat 2100
 caaatcatat cagctccacg tctagacatt cagcaaaaca cactgtgcat tgatgttgaa 2160
 actgtaaaca gtaaagatat caaaggtaac gacaacaaga gcctccattt tccatcacaa 2220
 attggctttg cttacaacgg caccattgaa acatacgatt gcaactcctac actcacagtc 2280
 aatggacact caatcactac caaatacttc aactctatct atccttcttc tgtcaaggcc 2340
 gccaaacgtg gaaagcacia gattgaattc attctccgct cctacatggc tcgcctccaa 2400
 cacactgtca ctgatcaaat caccctcgtc tttaaactcag cactcatcga tgtctcaatg 2460
 atccacaacg caatcagaaa tggaccaaac aaatgtcaca atgaagattg cgcaaaccat 2520
 cccatctggt acacagagc 2539

<210> 11

<211> 1005

<212> ADN

<213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 11

tccaccgacg acaagtactc ctactatcaa cagctcgact tcttcgtcca cgccgcattc 60
 ctcaacgcat acgcccagc aattgactca aagatccac tcaacttcac tcaccgtaac 120
 ctgaacttcc gtgtttcaca gcccaagaca aacttccttg tcgggtctcg cactcatgaa 180
 gtaaacacag gcaacaacac cagagtagaa gatctcaaca agcaccata caacaagtac 240
 cgtagtaata tcgtacgtgt atatggtgaa cgtggtgatc tcaacggctt cctcagcggc 300
 aaattcctct acttcctcg tcacatcttc gactcctgta ctgacaacac tctcacacga 360
 cacatccgcg tcacaaaagg tgaagaaact catgacatcg aactgttgag cgacgaatat 420
 gacgccactc ctttcatcaa aatcgacagt ccattcgag aagcaactgt actcaaattc 480
 ggtaaaactcc aacgtacca gtacgcatc ttogttaccg ctgatgacat cagggttggt 540
 tcaatgtccg tcgacggcta ccacaacatt tctaccaagg atggtgactg cggttcactc 600
 ctctttgacc accttcacia tggtgttgga gtcacatcg tcggcattgc tagcatccct 660
 cctgtcaacg gtgccctgac ctggaatgca gaaaaggaaa tgctctgcgg accaaatgat 720
 gactacgatt acgatccaga aaaagtcggt ccaccaagg tatggcctgt agaataatc 780
 actgctctca gcacgatcct caatcagctc aactatgtca ccggtgatgc cttcactaca 840
 cccaaactcc ctacaaacta tcagctaatt ggttgcgaga cactggacca gtacgtcaat 900
 gccgtaatc tcgttacggg ccaatttcct cagatcaagg aggactaga cgatttcac 960
 aacggatacg tcgccaactt gcaacgaggt actgaagcct acaac 1005

<210> 12

<211> 231

<212> ADN

<213> Virut liên quan đến mang

<400> 12
agggtaatcc atactactct aaacttcctt actacaacac agcacagatt tacttcgaga 60
aatcaaccac agtcatcgct tataacgggc ccaacaacaa actctcaaac atgtacactg 120
ataatctcaa accattccca taccatactc ttgagaaccg ttaccagagc gagaaggcta 180
agtatctcgg taagaaatta atcttgcata acaatccatt cgagacactt a 231

<210> 13
<211> 1278
<212> ADN
<213> Virut liên quan đến mang

<400> 13
cacttctcat cctttcgctc ccagccatth tcattcttcta ctgggctgag gggcttattt 60
ctgaccttcc tcttatctac ttactctct ggttctgggg ttcatggctt cttgctacaa 120
tttgctactc cctcacattc tctggacgca ggcgcaacaa ggacaaattc tattattcta 180
tcaacgtgca acaacacaat ccgtacaata aaagaatctt gtcattctaag ttctgttaag 240
tctgaggtct cctgctttta cgatgaacac attcatgaca ttctctgcacc aggcctgcac 300
atcattttata caattgggtt tgcttacctg aaaacagatt atgaatgtaa agaaggatat 360
cctcccgcca acaccgtcca acgatacttc cttgctattt tataccttag catctgttct 420
cttctagcct acattttcac taaaatcact cctatcgcta aatccttcat ctcttcacgc 480
tttcaaactg aatatatcat ggaaacgac gaaactgaaa aaggccaagt gactgttgcc 540
catgatagac ataagctcac accaacaagt tgccattcta ttctcaactc cactttcaat 600
cttctagtta ttggatgttt catatttcta tgtttcttca tcaactcctgc ttctgccacg 660
attctaagtg gaattcctga aaaagacaag tcagtcctca tggtcctcca cgtacttttt 720
gaggccgggc aaccaactga gcctccagac tgcattcatt gggctgctaa tgggtgactgt 780
ttctgcaact ctaccaactg cgactggagt gaacacgttc aaactctttg tcctcaaacc 840
tgtaacacat catctccac tacaacttct tctgccacac aatctcttcc gtcttccact 900
ccttctagtg acgccgataa tccttggtgt gcacaggacg atgccggttg ttacagctat 960
cttaatgact atgacgaatc aaaacgtaca caagccatta aatacacata cacactcagc 1020
acaaagaata caccacatat gaatgcaatc ctaactactg agcaatttga agaaatgtct 1080
ttagatgaag caagatactc tgacattgta tctttatacc gaatcaataa cataacatca 1140
gtccctggct gtatgtacaa tccagtatca tactatctcc atggcgactc tgttcctgtt 1200
acttgtccat caacaccaag atctttcggg acaacctaca atcatcaaat cagtagtcaa 1260
atcttgata atcacaaa 1278

<210> 14
<211> 748
<212> ADN
<213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 14
tccagaaggc gtctatgact tcgagacata ccgaccgggc acctgcgac ccatcatagc 60
tctcaatgcc gtcacgtatt gtatcgaacg tcaactgggtc tccgtgggc tctcactctc 120

atgcgcctca atctacccac acgaagacat gacaattcac cagtacaaag aagcattcgc 180
 atcctacact acagaattaa acacagaagt cacactcaaa caccaaccaa cattcgctc 240
 atacctcact ttcatgcttg tcaacgcacg tcacaaaatc gacatcgaca tcggcacagg 300
 cccagacacc ttctacacat cattcgacaa catcacatcc gctccatgca cagacgaacg 360
 atacaacgaa gtcatgacag ggattactcg cttatattat gcataccagt atgatagagg 420
 tgattttcct tgcaaataca cagtcaactca aacacacatc aaataccctg taattggcga 480
 tgtccctgtg gaacctgaag aatgcaaaga cctcacttgc aacagttacc cgccagtata 540
 tgggtgcctg atctccatcc agaagttcag cacttggggc cgctcttgt gctacgacgt 600
 tctcaaaagg gttttcaaac actgccgtaa ctgcgaccac ctcaattgca agatctcaag 660
 acagctcacg cgcttcaaaa atccactctc caacatccaa ccagtcgcat acacaaaact 720
 acacgacgac cgttaccta tccgtgac 748

<210> 15
 <211> 842
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 15
 catgattgct gtcttcgatg ctcagtttcc aacatagcct tccagatctg tgaccctgcc 60
 accaatgaat gcgcattccat cacaacagat tatagaaatt acaccgcaga cttcaagaca 120
 attagtttta acatcgtcga tccccaaagta gctaagacaa cattcaaagt tgggtgcgctt 180
 ttcacccatg gtacaacca tccaagcat ctctctacg atgttctctg caagtacgat 240
 gctccacctg gttctttctt tagctatcaa gctgagactg tccccaccgg tgcattttgt 300
 aacaagaacg catggatgtc ccctggccta gcatcaacag acattaaata caatggcttc 360
 ccaacattag attataaact aaattttgca actataaatc aagccattcg cagctacgac 420
 cccttaggag ctatagttca atgtaattac gatcagacat atatttccac tatcacagcc 480
 cgtcagcaac gttcacttct tctaaacgga gttacttaca cagatgaggt agatgctctt 540
 togtatagtc tctcctgaa tccgcatcac tgcgatttcg gagccgtgaa catacacttc 600
 gcatattcca ctactgctca tgtttctcta atagaaggtg accctgacca actctctttc 660
 gactgtacag gctgtctttt cactaacaac caaatgcaat gttccatcaa aggtattgac 720
 tctcactctt atcaaattac tgattctctt aatactttcg gcgctgcaac atgctctcat 780
 actaaagccg atcatctctg taatttcact gcttccgcat ctgagttcga totaaagtta 840
 at 842

<210> 16
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 16
 actcctatgc ctgcgtcgtc cctacctcct tccaaccgac ccactcgcaa tgcaaggctc 60
 atcgagattc ctcaatcctt cgcagtcgaa cgcggaaatg gatggatgtt ggcatatgcc 120

ccaggtaaaa atccactacc gggaaaagtc atcgctcgta tgcaggcatc tccattcatt 180
 caaggacttc aagaacaatc cctccaagtt gtcaagtcac ctgatggtaa gtattcaatt 240
 tcaaagagat acggtaaaat ggccatcact tatcttaatc ccaacgatcc cattctgcc 300
 aagcgttcaa cacagaagtc aatcgttccc gatccttccc ttgacataga gaacctagct 360
 gaaggatatcc acgcaatgag ccttgaagac gacgaatcca tggaaacaca atcataa 417

<210> 17
 <211> 1629
 <212> ADN
 <213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 17
 tgtccattcc acaccaccaa gaatgacacg tgcacgatct gcgcaaaccat cgacgacggc 60
 atctactctg tcgttccagc cgattcatca ttccacgagc tcgccaggga gctttccatc 120
 actctcacta atgtcaccaa tctctctcct aagagacatg aggcaaattt tcagacaaaag 180
 cctcgctcgag tcttccagta aaccgctacc actacatcaa ctcagccccg ttcaactaca 240
 caatcaccaa ttcacacact ggtgatggct ggggttgagtt tactggggac aatcacgagg 300
 cttgtgtcgg ccataagatc tgggccaaga aatattacca caccagtgga atattctgta 360
 aacctcgagc ttcacatcc actctcatca tcaatgggaa gaaccgacat tacaagacta 420
 aacactcact caaacgcgaa atcaaaactg cgcaggcact ctcacacatt ccagaagctg 480
 tccaattcca caaggatgag catgggtact atcgtgaaat ctcacaattc tcccttgctg 540
 atgtgttgca tgggttcgct aatcaaatcg aaccagactt cctagccaaa tacaccaacg 600
 agcgtaacat cacagtctcg aatgtaactt ggctctgcaa gaacatctgt aatcacaaat 660
 catgcaacat cctcaagatg gacatcttcg actacaccta cactgctac acaaaagcac 720
 agtcattcgc attacaagca tgtacaatat acaacttcga catcactcca gacaacatct 780
 gtccagaagg cgtctatgac ttcgagacat atcgtcccg gcaattgtgat cccatcaaag 840
 ctctcaacgc cgtcacgtat tgcacgaac gtcactgggt ctccgctgggt ctctcactct 900
 cctgcgcac tatttaccca catgaagaca tgacaattca tcagtacaaa gaagcattcg 960
 cactctacac tacagaattg aacacagaag tcaacttcaa acaccaacct actttcgact 1020
 cctatctcaa cttcatgctt gtcacagagc gtcacaacat caacattgac atcggcacag 1080
 gagcagacac cttctacact tcttccgaca acatcacatc agtccgtgt acagaagaac 1140
 gatacaacga agtcattggc ggggttactc gcttatatta tgcctaccag tatgatagag 1200
 gtgattttcc ttgcaaatac acagtcactc aaactcacgt caaataccct gtaattggcg 1260
 atgttgctgt ggaacctgaa gaatgcaaaa atccgatctg caacagttac ccaccagtct 1320
 acagtgtctt gatctccatc cagaaattca gcacctgggc tcgtctcatg tgtcatgata 1380
 ttctcaagcg agtcttcaat cactgtcgtg actgtgacca tcttaactgc aagatctcac 1440
 ggcaactcat gcgcttcaag aatccacttt ccaacattca gccagtcgca tacactaaac 1500
 tacacgaaga tcgtcaccta atccgtgacc gtctcacaca catggacttc acctcaggtc 1560
 aagagttcta cgctactgaa ttcacatg agttcaatga cgtcgaattc aagacactga 1620

acggtgata

1629

<210> 18

<211> 5001

<212> ADN

<213> Virut gây bệnh đầu vàng

<400> 18

```

atgcaatggt cgcgatcatt caccatgcac ttctcatcct ttcgctccca gccattttca      60
tcttctactg ggctgcgggg cttattttctg accttctctt tatctacttt actctctggt      120
tctgggggttc atggcttctt gctacaattt gctactccct cacatttctt ggacgcaggc      180
gcaacaagga caaattctat tattctatca acgtgcaaca acacaatccg tacaataaaa      240
gaatcttggtc atctaagttc gcttaagtct gaggtctcct gcttttacga tgaacacatt      300
catgacattt ctgcaccagg ctgcataatc atttatacaa ttgggttttg ttacctgaaa      360
acagattatg aatgtaaaga aggatatcct ccgcgaaca ccgtccaacg atacttcctt      420
gctattttat accttagcat ctgttctctt ctagcctaca ttttactaa aatcactcct      480
atcgctaaat cttcatctc ttcatgcttt caaactgaat atatcatgga aacgatcgaa      540
actgaaaaag gccaaagtgc tgttgcccat gatagacata agctcacacc aacaagttgc      600
cattctattc tcaactccac tttcaatcct ctagttattg gatgtttcat atttctatgt      660
ttcttcatca ctctgcttt cgccacgatt ctaagtggaa ttcctgaaaa agacaagtca      720
gtctcatggt ctccccacgt gctttttgag gccggtcaac caactgagct ttcagactgc      780
atccattggg ctgctaattg tgactgtttc tgcaactcta ccaactgcga ctggagtga      840
cacgttcaaa ctctttgtcc tcaaacctgt aacacatcat ctcccactac aacttcttct      900
actacacaat ctcttcggtc ttccactcct tctagtgcgc ccgataatcc ttgtgttgca      960
caggacgatg ccggttggtt cagctatcct aatgactatg acgaatcaaa acgtacacaa     1020
gccattaaat acacatacac actcagcaca aagaaaacac cacatatgaa tgcaatccta     1080
actactgagc aatttgaaga aatgtcttta gatgaagcaa gatactctga cattgtatct     1140
ttataaccga tcaataacat aacatcagtc cctggctgta tgtacaatcc agtatcatac     1200
tatctccatg gcgactctgt tctgttact tgtccatcaa caccaagatc tttcggta      1260
aactacaatc atcaaatcag tagtcaaatt ttgtataatc acaaaatggt aaatgttaca     1320
gtagatcaac gttgcaaaac acattctgat aactgttggg cttattataa caaggcatcg     1380
aaaagcattt ttatccaatt ccattcccagc tatgctcaga agtatcataa tagaatatta     1440
gagcccacta cattaattat tccattctat cctcccagag aactaaaaac actagccaca     1500
catcttggtc ctgcggttct tcgtaatgcc ggtgattatc aaattttcct tgaacctggc     1560
tggtctggta gaacatacct tgacggttat tcttatcatg aaatttatgc atccacacgt     1620
cacgattgcc gttgcaacat gatgtccggc gacaataagt atggtattaa cctcggagat     1680
gacgtccttc atgagaccat tccaactccc ccggtttata ctctagcgt tgttgctgtg     1740
ggcactacat ttacatatta taaattacat gacgcagtta aactcccatg ggaaagcgtt     1800
caatataacc atatagagga cattcctgcc ggtttccgtg atccctatga cttctccgtc     1860

```

gatactccat ctgggcctgt aactatcagt gttctggaag agtatcatga cggagattcc	1920
atacaggaga cggctcctaa gcgtttcttc atctactatc ggataatgac agcccgtott	1980
acaccctcac aagtcgaaca tcttaatcta tctacacacg ccacaagttc ctgggcagct	2040
gaaaattaca taagtaactg ctacgttggt agacagcaat tcgtcagaaa cactcaccga	2100
ttctcatttg ctctttctta cattgactac aatgtaacag ctggtagtgt tgttcgatgc	2160
aacgaattca acatacaaat ggatcttctt cttgcaacct ttggtatagc aacacgtacg	2220
tgggcggctg agtatcgtca tctgccacat tttctcacca agcgcgggtt ctatcccctc	2280
gaacctgtta cgggttctgc aatagattac ttaatagtcg aatacaacgc ccatgcttca	2340
cgttactcac atcaggcaac ttacatcaa tttggacatc cagttgctaa agctcaaacc	2400
cgtccggcgc tctgtccac ccctcgttcc atacgctatc aaggctcttg ttatgaagta	2460
gactggtctg tccgctctcc aacaccacct attagcgggt atcctgatat tggcacctac	2520
acttctggct acatcttcag agactatgac tattatagat tcaaacctaa gttcggtaac	2580
ggctctatatt taggcaaagt ttctgctgct gcttccatcg gcacttattc taagtgcggt	2640
aaagctcaat ccatcagtc ataccatgat caccgtatta atactgacct tggcacaccg	2700
gtttatgata gcgcttgatga ctccgcagct tatacaatcc cagtagtcaa atataatgga	2760
ccatactctc ttggcgttcc agacgttagt tgcgaaattc acgatgaaac cttaacatgt	2820
ggcactaaca gcacttttag attttcaatt tgttcccata aaatccctta tgacggtccc	2880
cattcagtc catgtatcaa ttctaaagat aacaaagtcc atattgtgaa acagcccgga	2940
tattcctact atatcgctgg tgaccaggt gcacttcata tctctcacia caagcataaa	3000
ccttacacct ccattctcaa agatcaaac aacctcttcc acttctccta tctctaccag	3060
gcagtagcta tgctgtttgg aagtctcggt tatttcatct tcggtctcta tgttactctt	3120
ttcatcctca ccaactctctg ggctaacatc aagtatatct tctacgctaa aacaacctac	3180
cttggttata ccgtgcctca acgctttatg gctggtaaga ccaactggtg taagatgtgt	3240
ggctcttgaca ctaaaccatct caagggtccat gctcgccatc acaagatcta catccacagt	3300
cctatgctcg gtcgaaactt cttcctctgg tctcctatct atgctattct ccttctatcc	3360
attatttctc cagcttcagc tctcgtcca cgacaggcac gtgtagagg ctctcctggc	3420
acottcaaac aagaaccgt catcaaata acatcatgct ctggtacaca atgcaaagtt	3480
gaccttgagt atacaggtgt tattcccatc tatgaagggt ctcagtttac agccgatctt	3540
aacatcgagg gttatcttcc aaccacaact agttacatag ttctgacccc cacatacacc	3600
tcactctgtg cctatctcta cacttctctt cctcctaaac tctgcgacgc tcgcatcaat	3660
tggctctgcc ttcatactgg ttcttgcaaa aatagctccg aatatctttt caagccttta	3720
ggtaaacaca cctccaacga ttacattggt gctaatacat ctaatcctct tcaatgcggt	3780
ctctgtcccc attcagctga ttgtgatact aaatttgac atctcaacca cggttgcgct	3840
accatcaacg atggtcacgc tgcagggtgc gtttggattt ctggcgccgt tgacagtgac	3900
atgattgctg tcttcgaatg ctcagtttcc aacatagcct tccagatctg tgaccctgcc	3960

accaatgaat ggcgatccat cacaacagat tatagaaatt acaccgcaga cttcaagaca 4020
 attagtttta acatcgctca tccccaagta gctaagacaa catttaaagt tgggtgcgctt 4080
 ttcaccacaga gtacaacca tcccaagcat ctctctacg atgttctctg caagtacgat 4140
 gctccacctg gttcttttct tagctatcaa gctgagactg tttccaccgg tgcattttgt 4200
 aacaagaacg catggatgtc ccttggccta gcatcaacag acattaaata caatggcttc 4260
 ccaacattag attataaact aaattttgca actataaatc aagccattcg cagctacgac 4320
 cccttaggag ctatagttca atgtaattac gatcagacat atatttccac tatcacagcc 4380
 cgtcagcaac gttcacttct tctaaacgga gttacttaca cagatgaggt agatgctctt 4440
 tcgtatagtc tctctctgaa tccgcatcac tgcgatttcg gagcctgaa catacacttc 4500
 gcatattcca ctactgctca tgtttctcta atagaagggt accctgacca actctctttc 4560
 gactgtacag gctgtctttt cactaacaac caaatgcaat gttccatcaa aggtattgac 4620
 tctcactctt atcaaattac tgattctctt aatactttcg gcgctgcaac atgctctcat 4680
 actaaagccg atcatctctg taatttctact gttccgcat ctgagttcga tcttaaagtt 4740
 aatggtaaag cggtcactat tactccagtt atcacacaat gtgacgtcgg gtctatatcc 4800
 gacaccattg ttggtgctgc aggtaatgat ggctatggta ccttacttcc tttcgcattc 4860
 ggcggcaaga catgggatta cattctcaag tatattctat atggcatcgg cacacctgtc 4920
 tttctcttcg ctctaatttg cttgctacag ttgctatccc acttatgcac gtccatgaga 4980
 acgaaagcca aacgatccta g 5001

<210> 19

<211> 3815

<212> ADN

<213> virus hoại tử huyết sinh và dưới da lây nhiễm

<400> 19

gcttcgcagg aaaccgttac aacatatgac gtcataaggct ctatataaga gatgacggac 60
 tcaccggtct cccagtctct aactgacgag tgaagaggct attccaagtg actaaggaca 120
 attttggaac atggaagata cgaataacca cccgtggcag tccataccta gaccaacgtt 180
 atttggatct tcacgtgaca gtgaaccaac agaagtcttt gaaaacgtat tcggagaaaag 240
 acaagcccca ggaaaccaat gtaactactg atgactgact aggtgactat ccataacttt 300
 tctaacagac gcaagtgcg aactttgtcg tcacttaca aagacgtaac cgctttcgtc 360
 cgtaactcat ataaatcttt ctctgtcttt cagacgacat accccaacaa atatcactgc 420
 gctactgtcc agatcacatt ctaccgtggt gttcatagg gaacagaccc gttctctact 480
 gcctctgcaa cgagtgttct atagacaatc tcaatgtcaa cggacagtgt caacactgtc 540
 atcccgacga cgaagaatgg acagaaaata tggccaagga catactgcat tcacgtcagg 600
 gcgaaccaga atcacttagt gaattgcttc gagaacgcac gaacgaaact cactccagcc 660
 agggaatttc tccaagcctt ctcaccccag gtccaaatca agagcctaga cccactaccg 720
 aacaacttct taatatgtct caagaactgt tccagtttct agacgaggaa gacaactctc 780
 aaactcctcc aagaacttca acaccagaac aaactgatcc taaggctctgc gtggataacc 840

tggaattcg agaggaaca ggaacggaa caattcaact tggaagtga tcagaaaact	900
cccttggaag tgttggaac agtgatgaca ggggtcaaaa gagacagaga ggaattactt	960
acatcagtga cacatcagat tcctctggat cagatgacga aaatctggat acaccacata	1020
gaaataaaaag aaccagaaac tccaacacca caaaagagac aagcggagga aacggcggag	1080
gagatcagga aagcgatcat ggaagcaatg gaaatcgact ggaacctacc aatggaggag	1140
agagcaatag tagcggaaca caaccgact ttattgaagg gactcccgac ggaccggacg	1200
aatggacgg aaggcgactg gaagagagt agattgataa acaagtggaa agtgcaacat	1260
ggtacacctt cgtcatcaga gaaaaaccac aaccaagaag actctccgga cgcacacacc	1320
aaacttcacc attacagatc atggtgacca ctggcacatc acatactccg gacacccaac	1380
caataagacc agacatagag ctacaatcct cgcctatctg ggagttacct ttgctgccag	1440
agccgaagct gaagcgacta cggacttgt tagagatc aagagatgga tactctatct	1500
tatcagatac ggtattgaac ggctttcgta ttttggctt ggccacgcca tttttaaacg	1560
aatcatcaaa tacttccaac gatacaaaag agacgaagac gcagtagacg gaccatgtcc	1620
atatatgact actacaagag aagacagagc tgaagaaaaa cctaaagaaa acagtgcaga	1680
atatgactac ctccaacact tagtcaaaac caaatctgca agaacagtcc aagaacttgt	1740
caataaactt gacgatgagg aatacaaaac gctatggacc cgcaccagag gacaatataa	1800
agacaaactc aggggaatac taacttacta caacaacaag aaaaagtcaa accaaagcca	1860
actgtcactc attacaaacc tgcaaaatat atcaaaaagg aaaccagact acgacaacat	1920
gcagtggata aagtacatgt tagccaacaa cgacatccgt gtaccagaaa tcttagcttg	1980
gataatcatc gtagcagaca aaaaactgga caaatcaac actcttgta tccaaggacc	2040
aacaggaaca ggaaaatctc ttaccatcgg tgcactactg ggaaaactga acacaggact	2100
agtaacaaga acaggagact ccaacacctt ccatctacaa aacctaactg gcaagtccta	2160
cgtctctctc gaagaacca gaatcagtca aataacagta gacgacttca aactcctttt	2220
cgaaggatca gacctagaag taaacataaa acaccaagag tcagaaatta tgggacgaat	2280
cccaatcttc atatcaacaa acaaggacat agactactgg gtaccaccag ctgatggtaa	2340
agctctacaa acaagaacaa aaaccttcca cctaacaaga cagataaaaag gtctgtcaga	2400
caggatgaac agccagtacg acatcaacc tccaccagac aagatcacca ggcacgactt	2460
cctaggcctc ttccaagaat acgaaaagga aatcgacgac atcatcgaca tcatgtgcgc	2520
cgattcaaca agatcaagcc caaggtaaaa gatccaggag ggatgcacat aatgaagacg	2580
aagaacacgc cgagggatca agtggaccag acccacacag atgtctacaa ttcaatacgg	2640
gagactcaat acatattact ttccaaacaa gaagatactt cgaattcgac gctgccaatg	2700
atggaaactt cgacggaaaa aacttatact gcctcccact acattggatg aacttatatc	2760
tctatggact gaaaagcagt gacagttcag caacagaaac acagcgatat aagatggtaa	2820
agtcaatgat gaaaacctac ggatggaaa ttcacaaagc aggcgtcgta atgcactcaa	2880
tgggtaccct tatgaaagac ttaaaggat caggaggaac atcatttgaa actctcacat	2940
ttacagacac cccatattta gaaatattta aggatactac tggactacat aatcaactag	3000

caactaagga agccgacgta acattagcaa aatggataca aaatccgcaa cttgtgacag 3060
 tacaatcaac agcagcaaac tatgaagacc caatccaaca atttggattc atggaacaaa 3120
 tgcgaaaccgg tgacagaaaa gcctatacaa tccatgggtga cactagaaat tgggtatggcg 3180
 gagaaatacc aacaaccgga cccaccttca tcccaaaatg ggggtgggtcaa ttaaaatggg 3240
 acaaaccatc ccttggaaac ctagtctacc cagcagacca ccatacaaac gactggcaac 3300
 agatcttcat gagaatgtca acaatcaaag gaccaaatgg agacgaactt aaacttggct 3360
 gcagagtaca agccgacttc ttcctacacc tagaagtacg actcccacca caaggatgtg 3420
 tagcaagttt ggggatgtta caatatcttc acgcaccatg tactggacaa ctaacaaaat 3480
 gttatattat gcataactaac taaatatatt cgatgtgcaa tatataccca cttatatcgc 3540
 gcttaagcca ataaacctat ataatctatt actatctata cctaccctct acacaaaacca 3600
 gctaccagc caaggtggga ctccggctac ccaggcatgg tgggacactt ctctactatt 3660
 gacgacgtac ttogtcacat acgtcactta caaaagacta aaatccctat cgtcagtcag 3720
 tcatttagag tcagggatat tgtccgccgt cacttagagc gcgaagcgcg agtatccatc 3780
 atttaaatta gtggtatgac gtcacatatt aagta 3815

<210> 20

<211> 8226

<212> ADN

<213> virut hoại tử sinh huyết và dưới da lây nhiễm

<400> 20

attttctaca tctggccaag gaaaatctct tcgtaggcaa gaacgaagtg gctatgggggt 60
 ttgaggttta gccgaaagag atctcgacaa tcttttagtag gatatacttc ttacactcct 120
 ggaaaagaaa aacattatct gtccagcaat gatacacggg tacgtcctcc attagctgtt 180
 gttttctttt cctcggcagg tcttacagtg tcggagcgca ggaacaggac gaaccacga 240
 gtgcctcct tacgagaagt gcagtaggtt ggcgctgttg agagcgggtg atctgggtaa 300
 tgtccgtcat tacgggtagc attacttggc gcatgcagtg ggaagtcag gccacgtca 360
 ccttaacaaa agactagtcc cactgtaacc tcggcgtata gcgaaagcgg ttagataaca 420
 ttaaataaccg gcttgtatgc tagaaactgg actgtcaata taccattgaa tgtctcaaac 480
 aaagaataaa gaacctgttg ttgaactgca aaatcaacaa accttcaacc aaaaagacca 540
 caatgcgcta gtgattgaac acaaaactag tgcaacaacg agcgccaag gcattcccgt 600
 tcgtccttca cgtaagaagg atgattatgt ggacatgaca cagggaatt tcaacctaat 660
 tctaaaactg ttaccaacaa tttctgaact acagaagagg catattcttc atctacttcg 720
 agaagaagta gaaggaaaga aagtttgttt cgtagagcga gaaaaacaga atccacttat 780
 ggctataaac gaactagccg ttaaagtttg aaagaagcct aaatacacat cgacgaaaac 840
 cggagctgac cacattccaa gctggactgt attggtcgag ttgcaggtt ttagogaagc 900
 agcaacatgt gacacagtta aaaacgcaaa aatgattgct gcttacaat tagttaaaag 960
 attttgtaaa tgggacccaa cctacattga aatttctgat tgtatgctgc cacctccaga 1020
 ccttacatcg tgcggggacg ttgagagtaa tcctggacct atcatacata gcgttgcat 1080

tgcaagaact ggttcagtat ggacacctgc caactttact ttcaatacca catcatcccc	1140
gggtagactg caagtacaaa tgtcatccag cgacaataga tatgggctca attctgtttt	1200
acttgacgca ggtggtacaa catggggcac agcttatttt tcacaacgct ggaacagtga	1260
ctttggatta cagccagatc taactataac tgtaacacca caactaactg gagaagaact	1320
tggttcaatt tattttgatg ctgttgaaac tacaatgca gaggaagcta tagaggcaac	1380
aattataaat actactccaa ttgatgtaat ggtagacaca acagcaggcc ctgtaccaat	1440
tgaaggtgat ttcaaaccga caaatgaaac tcccacgtgg gtaagtaaca caaagcccat	1500
tgatgtagcg acacataaga ctctgacta cgcaaatcgg tcagtactga ctccacaatt	1560
gatcacaaaa atgaaggacc atgtctatgc cttacaaaag gatgaagtta aagatgtaac	1620
acttgccctca ctcgatttcg gcttaaatcc atcaagtga ctcggaagat ggttgaaatg	1680
gttaactggc atagacatga gactccatct tggaaagaaa gtcacaaacc ataaagttag	1740
aatgtttgtg caaaaaacaa ggtttccact aaagacagca attgaggaac ttaacaatgg	1800
tactattcca catagattaa ggagggatgt tcgttacatt gaaaagccgt tcgataaaga	1860
ggaacatact gacatactgt tatctggtga cattgaggaa aacctgggc ctgaagggat	1920
ggaacaggta tcaataacac cagaacaact tcaaatgatt ctggcaatgc aaaaatcacc	1980
accaaagcca aagatcaaag aactaagtga aagggaaatt cagttaaggc tccaaggaaa	2040
tgaagcaacc cgcagacatc aaagatttaa aggtgagccc attgatccag ttctaactag	2100
agaagatata attagaaagc acaatcagca gaatggaata ttgcctgatg aaaaagaaca	2160
gccggtagtg gtaaataacg tacacccttt ggagaaggag tattccattg aaaaggaagg	2220
aatggtgtgg gacgaagaac aatttttgac gtatatacat gacaagtcac caagcaacga	2280
tcactatgcc tgcactata acgttattac acataacaga ttcggtgtac ttgaaatgcc	2340
agaagatcca cttgaaatga ttgatcatta tgagccagag gaagaaccaa aaacaaaacc	2400
taaaactaaa agtggttaaca agagagaact aaatgatgaa accttttaca gaaagaagaa	2460
gacaaaaaca acaaaagagc caaaaacaca agaacaaaag aaaattgacc acgataacat	2520
gttttcacga ttgctgagaa ggcttgacaa accacaaatt gtagcagttt ggctaaacaa	2580
cagaccatca cgtaaattgg tcgaaaaatt agctgagagt aaattcggaa ttggatggca	2640
agcaaaagaa gagtacacaa ccagcatggt aattgtatct ggatatatca attgtgaacc	2700
attacccta atcgtagata agcttctctc cgctgataac aactatgaca tgtggcaaca	2760
gactgacaag tattttaaca atttaatcac actgtgtaac cgcgtcagtg acgttaccta	2820
cactagcgct cagctgtgta gagatgcac tatcttgaat aacaagaaga tgcattgtga	2880
aatggaaac attgtttcaa tggaaaatca gtctgaaatt gatagtcaaa ctaaattctt	2940
ttcactgtta gaagatgata acaacttcc aattgtagat gagctaagag tattagctga	3000
tatgacggca caaagaagca acgtaaacac tgctggtaac catcttcgtg ataatgactc	3060
tattagggcc gacgctgttc tagctaacaa tacagtacgt aacaattgtc aaattccaat	3120
tcctgtaaca acactaatac caagacaaat tcgtggattg aatggtgtac ttgtaaatca	3180

gcaattacgg ttacagggaa ttgaaacaca cattacagac agttatatattt caaaagctga	3240
gccatctgac tattcgaaac aactgtctga aatggttaat gctcaaaaaa catcaacttg	3300
gcgagcaaac aatatcgcat cacaggggtg ggacatgttt gatactgtac agttaaatac	3360
aaacatatcg caaaaagatc tttcaatgga cactgctttg acaaagctta tgttggtgta	3420
ccagctaaca acacaaaatc tgccagcaac acaattacca tcaagcattt attctgcatt	3480
tgattcaaga acacagccca ctttacagga tggaatttggt ggtataaata atgggtgctaa	3540
tatatatttgt gaacaatgcg gtggattagc cgcgccagtc tttccattta gtgggggcac	3600
cggagaaaatt actttccatc ttactttaca atctgttcca caggaatttc aagaatcagc	3660
aattttcgta ccagcaactg cactacaagc tgcaaaagag ggtgctcgaa cattggcaat	3720
gtatgtttta atgtttgcag aatggccatt tggatatgat acaaaaaacta aacaaacaac	3780
agacaatgct ggtaataatc aatcagatca aattttcatt cactccgaat ctactgtaca	3840
tattccagga caaaaacaaa tgcatattgt gctgccaaaga aaagtgaaca tggatgaacc	3900
cactacaatt gcagaagcaa atgcacgtgt agtaattcaa ccaacatacg gtacagtggc	3960
agctggagca ggtgtcgcaa atggtaatat taacgtagct gctattgggtg tggccttgcc	4020
aactgtaaatt ttgactgact atcttgtatc ctgggcaacc gatttcacac ttggcgacat	4080
aaaacaattg attgaaagaa tgaaaacaac actgcccaatt agtcgagact tgatggcagc	4140
acgtcaaaat gctatgttat tgagtactct atttcctcca ctaattcaga gcaatgtggc	4200
ttcagacaca aaggaagtcc caggaacagc tggagcatac actgcatgto ttgcaaaactt	4260
aggtattcct gaaacactaa cagttaactg gggagaagat ataaatgttc agccattgta	4320
tcagctactt gaaacggaca tcacagccca caatcggtag gtattaaacc tgtttaaaag	4380
agaagaagtg gtagctgggtg catatgaatt tggatgggta ggacacatgg ccagttatat	4440
gatgggactc cttctaacaa tgaatatatc atcagtgttt aacgtctggt attcaacaag	4500
acgtatttca acaaaggcgt gggacacagc atatgatagt aacatccaag catatcagga	4560
catgcattat caaatgtttt cgtggagttc aatgcaaggt agtattgcac cagcaatggt	4620
ggacgaaatt cttcataacc tttgtggcca aatgtttggg ttcagcttac cattgagaca	4680
agtcttattt aacgcattgc caatcacttt ttcacgtttt ggaagttgga tgtcgccatg	4740
agtttctgat ggtttccaaa ctgtaaggta ttatgatata ggtccaccag tcattaatgc	4800
aaaacgtgat ggggaagtac cagtaagtat gattgacgca tggacttata aatttacaga	4860
aaaattgccc aaaagttttt tgccatggcc aatgccagaa ggaaaggaca gtacaatggg	4920
atatgatccg gaaaaagaac cagcactaat tgataattca aatgagacag gcaatgtatt	4980
cagaccattt atggcaagaa atggcaacaa ttctaattat ttgccaacca actacacaat	5040
tgacgtatca cagaatggtc atgacgagag ttgtattaat gttgaccttt ttaacaatgt	5100
tgccgggagta aactaacaa attatgatgg aaccgcaaca aacgcagacg tcgtaccaac	5160
aggatcatac attaaagcaga gagcaatgcc tatcgatgca aatgcggtag gaccaactga	5220
aacactcgac gctgctaacc atacaaaacc ttttgcattt gaaggaggaa gactcgtata	5280
tttgggtgga acaattgcaa atacaaccaa tgtggtaaac gcaatgcaga ggaaacaaag	5340

gctttcaaaa ccagcattca agtgggcaca tgctcagaga caacgtgtat atgacagcag	5400
tcgtccaggg atggacccaa tcacaaagtt gtgtgcacga aagtcggggtt ttatgaatgc	5460
ccgttccaca gcaatgatgg cacccaagac tggactcagc gctgttatag atcaagcacc	5520
aaatacatct caagacttga tcgaacaacc gagtcagcaa gaggttatgg atatgcaagc	5580
gacagcaaca gtataaatca gatatatcaa attgcattgc atagaaaggc aaaacatata	5640
acagcaaaga aatggcaaga attaacaaaa ggtatttata atgcatctac cctgacaccg	5700
aagatagttg accaaattat aaaggatgaa ggaagcggga ccgataagac aaaatatgta	5760
aatgttccta aaataattac tgacaaagaa ttacaaacat tctatgtacc aagaagcaac	5820
gcagatctag ttataagaag aatacgttta atcgaccttt ggcgtaacct aaaaccagat	5880
caaatggacg agattcgtaa ttacactcat ctagattata tctttgtaca aaacatttgt	5940
atctatatgt tagtatttgg aatagacaca gttaaactt ttagacaaat aggtctatct	6000
aatgaaagga atgaatttat tgaaattgca aaacagttat caaccaaagg gaaaagattt	6060
gttgatgatg ttgataatat gaaacaaaag gtatgtgaaa tagctactat tgttggttat	6120
atggacccaa atgttgataa aatagatgta atggaagaag tcaactcact cgcagctgaa	6180
ggtaatgaac atggtataga tagagataat tggaatgatt tgtttacaaa aacatgcaaa	6240
gaagtaatga catggtacaa aggacatgaa tttattagtt ttgatgatta cataaaggaa	6300
ggaatgtggg taacaagtgg aagttcaagt attgggaaag tggattggac aaaagatgga	6360
gaaaatggga aatttaaagc aaggaaaaat atgttggttac aaatttatac accgcaagaa	6420
ttggccaaca ttgtttatgc ttgggatgga aagttacatt cacgtgtctt tattaaaaac	6480
gaaatgagta aattaagact tgctgtggca tctaacatcg aagcatatat tcatgaatct	6540
tatatgcttt tcctatatgg tcatggtttt aaagaatact ttggagtgc gcttgacgaa	6600
aaaccagatc aacagcatca gagagaaatt gaaatgattg agaaactaca agctggatac	6660
tttggttac catttgacta tgcattctt gatcatcagc caacaacttt cgaagttaag	6720
acaatggtga gaagagttgg agaaattgta gttagtcaag tacctaagaa ttattactat	6780
cagacacaaa tgctagtcaa caagattggt aatgcatatg ataaaagtta tctgtctgga	6840
aatattaaaa atacaaaatt tgaaaatata aaagtcaaag gtggagtacc atcaggagtg	6900
agaataacga gtttgttggg taacatgtgg aacgctataa ttacaaagat cgcaataaat	6960
aatgttattg gaattattgg atacgacca atctcccaa tctcgttacg cggagacgac	7020
gttgctatat taagtaaaga tccagcagct ctttatttac ttagactatc atatgctgca	7080
attaatgcaa ttggcaaaga tagtaagtta ggtatatctc caaaagtatg tgaattttta	7140
cggaatgaga tatcagtgc aggagtacgc ggttgacat gtagaggaat aggtggcata	7200
agtcaacgaa aaccatggaa tccacaacct tggagtccaa atgatgaagt cgaaacaaat	7260
gcaagcaaca tttcattatt agaaagacga gcaggaattg aacttcaaca attacaccac	7320
ataaaciaag ttaaattggtc gagacacgtc agacaaagtt ataaatatct agaattgcca	7380
aaacgacttg gtggttttgg aatctatcga ttccaggggt ggttacctaa cggcaaatta	7440

ccacttgcca aaaagccctt ggттаacgta gaggacatac atccaagcca agagctgttt 7500
 ttgcctttta gtgaacaaca gaaaaagatc ttagcacagg ttgaaatgac aaacaaaatg 7560
 caaacagatg atatacctgg gacacaaaaa ttattttcaa aggaatggat acagaaagtg 7620
 cgtgcaaaaa agatcatatg gagtagaaat cagacaatac caatccatac tgatcacaca 7680
 gtacgtatac caagatggga cgagaaaatc aaattcccaa ggtataaatc acaatatata 7740
 ttaaataata aatcaactt aacaatggag caagtgttaa gacagtataa tctcctaaaa 7800
 gaagtggac ggtatgataa agatctaaaa gtgccaaagt tattagacat tttggacaaa 7860
 tggttcccg tccaaagtag taaaattaaa acatatgaaa gtcaagggtt tcatagaaca 7920
 gacgcaatta atcttgctgt tggtgaaatt ccaactgaac cagcagttaa aataaatcct 7980
 atactaataa actttgttaa gttacatctt gaaagacaag gtattagaca tcagagaggt 8040
 agaaataaga tcgccaaatt tatttaccaaaa aaacaaaac aagcagagaa catgatactg 8100
 caaagtagtt tacaacaaat gtataggtac taaattaagg gaccaataaa gaaacttcga 8160
 gtttcctata acacattccc agttgggtt tgtggccagc catgcggtt gccctaggtt 8220
 atagtc 8226

<210> 21
 <211> 2731
 <212> ADN
 <213> Virut hoại tử tủy lây nhiễm IPNRDRP

<400> 21
 acccgacata ccacgactgt ttatgtatgc acgcaagtgc cccctaacaa atctctatac 60
 acacaactca tgatatgtcg gacatcttca actcaccaca gaacaaggct tctatcttga 120
 gcgctctcat gaagagcaca acaggagatg tagaagacgt gctgataccc aagcgcttca 180
 ggccagccaa ggatccctt gacagccgc aagccgcagc acagttccta aaggacaaca 240
 agtatcggt acttaggccg cgagccattc cgaccatggt cgaactagag acagatgccg 300
 ctctgcctcg actgcgacaa atggtagacg atggcaagct taaggacacg gtaagcgtcc 360
 cagagggaac cactgcattt taccacaaat actaccatt ccacaagcca gatcatgacg 420
 aagttgggac gttcggggct ccggacatca cacttctgaa gcaactcacc ttcttctgt 480
 tggaaaatga cttcccaca ggaccggaga cactcaggca agtcgcgag gccatagcca 540
 cactccagta tggctcaggc agctactccg gacaactgaa caggctccta gcaatgaaag 600
 gagttgctac tggcaggaat ccaacaaga ctccaaaaac agtaggctac accaacgagc 660
 agctggccaa actgctggag caaacctac cgatcaacac tccaaaacat gaggaccccg 720
 acctcgggtg ggccccagc tggttgatca actacaccgg agatctgagc acagacaagt 780
 catacctgcc acatgtgacc ataaagtcct cagccggcct accgtacata ggcaaaacca 840
 aaggagacac gactgccgaa gcgctcgtac tggccgactc cttcatacgt gaccttggaa 900
 aagcagcaac gtcagcggac ccagaagctg ggggtgaagaa gacaatcacc gacttctggt 960
 atctaagctg tgggctgcta ttcccaaagg gcgagagata cacacagatc gactgggaca 1020
 agaagaccag aaacatctgg agtgccctt acccaacaca cctactacta tcaatggtgt 1080

cgtccccctgt gatggacgag tcaaaactca acatcaccaa caccagacc ccattctctgt 1140
 acgggttctc accattccac ggagggatgg acaggatcat ggcaatcatc agagacagcc 1200
 tggacaacga cgaggaccta gtgatgatat atgcagacaa catctacatc ctgcaagaca 1260
 acacgtggta ctcgatagac ctggagaagg gcgaggccaa ctgcacccca caacacatgc 1320
 aggccatgat gtactacctc ctgacaaggg ggtggacgaa cgaggacggc tctccacggt 1380
 acaacccgac gtgggcaacc ttcgccatga acgttgacac gtcgatggtc gtggactcat 1440
 cctgcctgct aatgaatctt cagctgaaga cctacggcca gggcagtggg aacgccttta 1500
 ccttcctgaa caatcacctc atgtccacga ttgtcgtggc tgagtgggta aaagcaggaa 1560
 aaccaaacc catgacaaaa gggttcatgg acctcgagga aaagacgggg attaaactta 1620
 agattgagcg agagctaaag aaccttaagg agaccatcat cgaggccgtg gaaacggctc 1680
 cccaggatgg ctacctgcgc gatggctccg acctaccacc gcacaggcca ggaaaagcag 1740
 tagagcttga cctgctgggc tggtcggcca tctacagccg ccaaattggag atgttcgtcc 1800
 cagtcctcga gaacgaacga ctaattgcat cagccgcccc cccaaaaggg cttgagaaca 1860
 agacccttgc ccggaaacc ggggccgaga ttgcatatca aatagtaagg tacgaagcaa 1920
 tcaggatggg gggcggtctg aacaatccac tgctggaaac cgcagcaaaa cacatgtccc 1980
 tcgacaagag gaagagactg gaggtgaagg ggatcgacgt gacaggggtc ctcgacgact 2040
 ggaacaacat gtcagagttc ggaggagacc tagaaggaat cacactatcc gaaccctca 2100
 caaaccagac cctgatagat attaacacac cactggagag ctctgaccca aaggcgagac 2160
 cacaacacc caggtctcca aagaaaacc tagacgaggt aacagccgcc ataacatcgg 2220
 ggacctataa ggacccaag agcgagtggt ggcgactgct tgaccaaaaga accaaactcc 2280
 gggctcagcac actgcgagat caggcctcgg cgctgaaacc ggcacatcc tcagtagaca 2340
 actgggccga agccacggag gaactagcgg agcagcaaca acttctcatg aaggccaaca 2400
 acctgctgaa gagcagcctg acggagacca gagaagcact ggaaaccatc cagtccgaca 2460
 aatcatcgc tggaaaatcc aatcccgaaa agaaccggg aacagcagcc aaccagtg 2520
 ttggctatgg ggaattcagc gaaaagattc ctctgactcc cacgcaaaag aagaatgcca 2580
 agcggaggga gaagcagaga cgaaaccagt gagaagaaca aaccggggag aatccgaaat 2640
 gaccagctg gactcatatg caagctccgc gccgcacggc aagctgaaca aaagtagtga 2700
 cccgacaacg tgccaccaac atgacccag a 2731

<210> 22

<211> 1180

<212> ADN

<213> Virut hoại tử tụy lây nhiễm

<400> 22

tgagatccat tatgcttcca gagactggac cagcaagcat cccggacgac ataacggaga 60
 gacacatctt aaaacaagag acctcgtcat acaacttaga ggtctccgac tcaggaagtg 120
 gcattcttgt ttgtttccct ggagcaccag gatcaagggt cgggtgtcac tacagatgga 180
 atgcgaacca gacggagctg gagttcgacc agtggctgga gacgtcgag gacctgaaga 240

aagccttcaa ctatggaagg ttgatctcaa ggaaatacga catccaaagc tcaacgctgc 300
cggccggcct ctatgcactg aacgggagcg tcaacgctgc tacattcgaa ggcagtctat 360
ctgaggttga gagcctgacc tacaacagcc tgatgtctct aacaacgaac cccagggaca 420
aagtcaacaa ccaactggtg acaaaaggag tcacagtcct gaacctacca acagggttog 480
acaaaccata cgtccgccta gaggacgaga caccacaggg tottcagtca atgaacgggg 540
caaagatgag gtgcacagct gcaattgcac cgcggaggta tgagatcgac ctcccatccc 600
aacgcctacc acccgtccca gcgactggaa ccctcaccac aatctacgag gggaacgcag 660
acatcgtcaa ctccacaaca gtgacgggag acatcaactt cagtctggca gacaatcccc 720
ccgcagacat caggttcgac ttccagctgg aattcctggg ccttgacaat gacaccccag 780
tggtcacctg ggtcagctcc gtgctggcaa caccgacaa ctatcgaggc gtgtcagcca 840
agatgacca gtccataccg accgagaaca tcaccaaacc ggtcacgaga gtcaagctgt 900
catacaaagt caaccaacag gctgccatcg gcaacgtcgc caccctgggc gcactggggc 960
ccgcgtccgt gtcctttctc tcaggaaaag gaaacgtgcc tggcgtgctc agaccaatca 1020
cactggtggc ctatgagaaa atgacaccac tgtccatcct gaccgtagca ggagtgtcca 1080
actacgagct gatcccaaac ccagaactcc tgaagaacat ggtgacacgc tatggcaaat 1140
atgaccaga aggtctcaac tatgccaaga tgatcctgtc 1180

<210> 23
<211> 852
<212> ADN
<213> Virut hoại tử tủy lây nhiễm

<400> 23
agaggaattc gaaaagtcgc agctcctgta ctgtcaacgc tgtttccaat ggcagcacca 60
ctcataggaa tggcagacca attcattgga gatctcacca agaccaacgc agcaggcgga 120
aggtaccact ccatggccgc aggagggcgc taaaagacg tgctcgagtc ctgggcaagc 180
ggagggcccg agggaaaatt ctcccagacc ctcaagagca ggctggagtc cgccaactac 240
gaggaagtgc agcttcgcgc cccctcaaaa ggagtcacgc tcctgtggt gcacacagcc 300
aagagtgcac caggcgaggc attcgggtcc ctggcaatta taattccagg ggagtacccc 360
gagcttctag atgccaacca gcaggtccta tccacttcg caaacgacac cgggagcgtg 420
tggggcatag gagaggacat acccttcgag ggagacaaca tgtgctacac tgcaactcca 480
ctcaaggaga tcaagagaaa cgggaacata gtatcgaga agatctttgc tgggccaatt 540
atgggtccct ccgctcaact aggactgtcc ctacttgtga acgacatcga ggaaggagtt 600
ccaaggatgg tgttcaccgc cgagatcgcc gacgatgagg agacaatcat accaatccgc 660
ggtgtagaca tcaaagccat cgcagcccac gaacaagggc tgccactcat cggcaaccaa 720
ccaggagtgg acgaggaggt gcgaaacaca tccctggccg cacacctgat ccaggccggg 780
accctgcccg tacaacgcgc acagggctcc aacaagagga tcaagtacct gggagagctg 840
atggcatcaa at 852

<210> 24

<211> 1734
 <212> ADN
 <213> Virut hoại tử tủy lây nhiễm IPNVP5A

<400> 24
 ggaaagagag tttcaacggt agtggttaacc cacgggcgga gagctcttac ggaggagctc 60
 tccgtcgatg gcgaaagccc tttctaacaa acaaacacaa ttaatatcaa tgcaagatga 120
 gcacaaacaa agcaaccgca acctacttga agtccattat gcttcagag actggacctt 180
 ccagcattcc ggacgacata acggagagac acatcttaaa acaagagact tcgtcctaca 240
 acttagaggt ctcgactca ggaagtgggtg ttcttggttg tttccctgga gcaccaggat 300
 caagggtagg tgctcactac agatggaatg tgaaccagac ggaactagag ttcgaccagt 360
 ggctggagac gtcacaggac ctgaagaaag ctttcaacta cgggaggctg atatccagga 420
 aatacgacgt tcaaagctcc acgctgccgg ctgggctcta tgccctgaat gggaccatca 480
 acgccgccac cttcgaaggc agtctgtctg aggttgagag cctgtcctac aacagcctga 540
 tgtctctgac aacgaacccc caggacaaag tcaacaacca gctcgtgacc aaaggagtca 600
 cggctcctgaa cctgccaaaca gggttcgaca aaccatacgt ccgactagag gacgagacac 660
 cccaggggtct ccagtcaatg aacggggcca agatgagggtg cacagctgca accgcaccgg 720
 ggaggtacga gatcgacctc ccatcccaa gactgccaac cgtccctgag actggaaccc 780
 tcaccacgat ctacgagggg aatgccgaca tcgtcaactc gacgacagtc actggagaca 840
 ttagcttcag cctcgcaaac aaccccaccg cagacatcaa gttcgacttc cagctggact 900
 tcctcgggtc cgacaacgac gtcccgggtg tcacgggtgac cagctccgtg ctggtaaacg 960
 cagacaacta cagaggcgcg tcagccaaga tgacgatgtc catacccacc gagaacatca 1020
 cgaagccgat cacaagagtc aagctgtcct acaaagtcaa ccagcagaca gcgatagcca 1080
 acccagccac cctgggggaca ctaggtccag ggtccgtctc cttttcttca ggaaacggca 1140
 atgtccccgg tgcctgaga cccatcacac tgggtggccta tgagaaaatg acacccagt 1200
 ccactcctaac tgtagctgga gtgtccaact acgagctgat cccaaccca gaactcttga 1260
 agaacatggt gacacgctat ggcaagtatg acccgaagg gctcaactat gccagatga 1320
 tcctgtcca caggaggag ctggacataa ggacagtctg gaagactgag gagtacaagg 1380
 agcggacaag agtcttcaac gagatcaccg acttctccag tgacctgcc acgtcaaagg 1440
 catggggctg gagggacata gtcagaggga tccggaaagt cgcgccccca gtactgtcaa 1500
 cgctgtttcc gatggcagca ccactcattg gagtggcaga ccaactcatc ggagatctca 1560
 ccaacaccaa cgcagcaggc ggaaggtacc gctccatggc cgcaggagga cgtacaagg 1620
 atgtaatgga ctctggggc agcggcgagc ccgacgggaa gttctcccag gctctaaaga 1680
 acagactgga gtctgccaac tacgaggaag tcgagcttcc tcccccttca aaag 1734

<210> 25
 <211> 767
 <212> ADN
 <213> Litopenaeus vannamei

<400> 25

```

ggactgcgca gtgacatcgc catattgact ggaagcgccg tgctgstggc tcggatttct      60
cccgcttatt tccttcccaa aatacatcat ggcattctgc aagaagattc tcctgaaggt      120
gatcmtcctt ggagactcag gtgtaggcaa aacatccctt atgaaccagt ttgttaacaa      180
gaaattcagc aaccagtata aggcaaccat tggagcagat ttcctcaca aggaggatcat      240
ggttgatgac agattgggta ccatgcagat ctgggataca gctgggtcaag aaagatttca      300
atcgttaggt gttgcattct atcgaggagc tgattgttgt gttctcgtct atgatgttac      360
atctcccaat accttcaagt ctctcgattc atggcgtgac gagtttctaa ttcaagcctc      420
accaagggac cctgaccact tcccatttgt tgtcctgrgt aacaagattg atctggagaa      480
tagggcggta tcgacgaagc gagcacaaca atgggtgcat agtaaaaatg aarttcccta      540
ctttgaaact agtgcaaagg aagctattaa tgtggagcta gctttccaga ccattgcycg      600
caatgctctt gctcaggagt cagagggtga gctgtacaat gagtttccag accagatcaa      660
attgaccaat gacaacaagg ctaaacagga tgcgtgctct tgctaataat cactctgtaa      720
tgattttcta gtacggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa      767

```

<210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 26
 gaaactctag atgggtaaca agattgatct ggag 34

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 27
 agccggatcc tagcttacga 20

<210> 28
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 28
 gcataggatc ctgggtaaca agattgatct ggag 34

<210> 29
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <400> 29
 gagtactgca gcatcctgtt tagccttggt gtca 34

 <210> 30
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 30
 gatctctaga gaggtggagc tgtacaatga g 31

 <210> 31
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 31
 cgtctgcagc gcatcttgc 19

 <210> 32
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 32
 gatcggatcc gaggtggagc tgtacaatga g 31

 <210> 33
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 33
 gactactgca gcatcctgtt tagccttggt gtc 33

 <210> 34
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 34
 gaatcggatc ctaatgtgga gctagctttc cag 33

 <210> 35
 <211> 34

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <400> 35
 gagtactgca gcatacctgtt tagccttgtt gtca 34
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <400> 36
 tacgtctgca gcgcaccttg 20
 <210> 37
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <400> 37
 gaatctctag ataatgtgga gctagctttc cag 33
 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <400> 38
 gggatacagc tgggtcaagaa a 21
 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <400> 39
 cgagagactt gaaggtattg gg 22
 <210> 40
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn
 <220>


```

<221> misc_đặc điểm
<222> (1)..(1)
<223> 5' 6-FAM

<400> 40
cgaggagctg attgttgtgt tctcgt
26

<210> 41
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 41
gtggagacct tccaacagta tg
22

<210> 42
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 42
ccttcttggt gacctccttg at
22

<210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<220>
<221> misc_đặc điểm
<222> (1)..(1)
<223> 5' 6-FAM

<400> 43
tgcgtgacat gaagcagacg g
21

<210> 44
<211> 9
<212> RNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Các trình tự ARN ví dụ có thể được sử dụng để tạo vòng lặp

<400> 44
uucaagaga
9

<210> 45
<211> 9
<212> RNA
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

```

<223> Các trình tự ARN ví dụ có thể được sử dụng để tạo vòng lặp

<400> 45
uuuguguag

9

<210> 46
<211> 614
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn Rab7 có sự bổ sung không mã hóa cho vòng lặp được sử dụng làm khuôn để khuếch đại

<400> 46
ggcaatagca tgccgtcctc tagattacat ctccaatac cttcaagtct ctcgattcat 60
ggcgtgacga gtttctaatt caagcctcac caagggaccc tgaccacttc ccatttggtg 120
tcctgggtaa caagattgat ctggagaata gggcggatc gacgaagcga gcacaacaat 180
ggtgtcatag taaaaatgaa gttccctact ttgaaactag tgcaaaggaa gctattaatg 240
tgagactagc tttccagacc attgctcgca atgctcttgc tcaggagtca gaggtggagc 300
tgtacaatga gtttccagac cagatcaaat tgaccaatga caacaaggct aaacaggatg 360
ccatggccca aagacttaag agtctatcac tcctaggcac ctttccgga tataaacgcc 420
aggttgaatc cgcattagga gctacgatgg atgagtctgg gtggagcgcg ctcgatttat 480
accgtgagta ggctcgtgca agaaccgcaa gatgcgctgc agacgtaacc gtaatcgtaa 540
gctaggatcc acgctagcat aacccttgg ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt 600
ggcatatgaa agca 614

<210> 47
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mã hóa Rab7

<400> 47
ttacatctcc caataccttc aagtctctcg attcatggcg tgacgagttt ctaattcaag 60
cctcaccaag ggaccctgac cacttcccat ttgttgcct gggtacaag attgatctgg 120
agaatagggc ggtatcgacg aagcgagcac aacaatggcg tcatagtaaa aatgaagttc 180
cctactttga aactagtgc aaggaagcta ttaatgtgga gctagcttcc cagaccattg 240
ctcgcaatgc tcttgcctcag gagtcagagg tggagctgta caatgagttt ccagaccaga 300
tcaaattgac caatgacaac aaggctaaac aggatg 336

<210> 48
<211> 162
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự không mã hóa vòng lặp

<400> 48
 ccatggccca aagacttaag agtctatcac tcctaggcac ctttcccga tataaacgcc 60
 aggttgaatc cgcattagga gctacgatgg atgagtcctgg gtggagcgcg ctogatttat 120
 accgtgagta ggctcgtgca agaaccgcaa gatgcgctgc ag 162

<210> 49
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Phần kết thúc T7

<400> 49
 ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttg 48

<210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 50
 catcctgttt agccttggtg tc 22

<210> 51
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 51
 tgggtaacaa gattgatctg gag 24

<210> 52
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 52
 ggatcctaatac gactcact ataggcatcc tgtttagcct tgttgtc 47

<210> 53
 <211> 237
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 53
 tgggtaacaa gattgatctg gagaataggg cggatcgac gaagcgagca caacaatggt 60
 gtcataagtaa aaatgaagtt ccctactttg aaactagtgc aaaggaagct attaattgtg 120

agctagcttt ccagaccatt gctcgcaatg ctcttgetca ggagtcagag gtggagctgt 180
acaatgagtt tccagaccag atcaaattga ccaatgacaa caaggctaaa caggatg 237

<210> 54
<211> 237
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 54
catcctgttt agccttggtg tcattggtca atttgatctg gtctggaaac tcattgtaca 60
gctccacctc tgactcctga gcaagagcat tgcgagcaat ggtctggaaa gctagctcca 120
cattaatagc ttcctttgca ctagtttcaa agtagggaac ttcattttta ctatgacacc 180
attgttgtgc togttcgtc gataccgcc tattctccag atcaatcttg ttacca 237

<210> 55
<211> 595
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 250 VP28 RNAi fragment- synthetic template

<400> 55
ccatgggcag cagccatcat catcatcatc acggatccgg caggatcac aacactgtga 60
ccaagaccat cgaaaccac acagacaata tcgagacaaa catggatgaa aacctccgca 120
ttcctgtgac tgctgaggtt ggatcaggct acttcaagat gactgatgtg tcctttgaca 180
gcgacacctt gggcaaaatc aagatccgca atggaaagtc tgatgcacag atgaaggaag 240
aagatgcgga tottgtcatc actcccgtag agggccgagc actcgaagtg actgtggggc 300
agaatctcac ctttgaggga acattcaagg tgtggaacaa cacatcaaga aagatcaaca 360
tcactggtat gcagatggtg ccaaagatta acccatcaaa ggcctttgtc ggtagctcca 420
acacctctc cttcaccccc gtctctattg atgaggatga agttggcacc tttgtgtgtg 480
gtaccacctt tggcgacca attgcagcta ccgccggtgg aaatcttttc gacatgtacg 540
tgcacgtcac ctactctggc actgagaccg agtaagcggc cgcaactcga gaacg 595

<210> 56
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 56
gactatctag acattcaagg tgtggaacaa cac 33

<210> 57
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 57
 acgtaccatg gctcgggtctc agtgccagag t 31

 <210> 58
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 58
 acagactgca gctcgggtctc agtgccagag t 31

 <210> 59
 <211> 250
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Sản phẩm PCR VP28

 <400> 59
 attcaaggtg tggaacaaca catcaagaaa gatcaacatc actgggtatgc agatgggtgcc 60
 aaagattaac ccatcaaagg cctttgtcgg tagctccaac acctcctcct tcacccccgt 120
 ctctattgat gaggatgaag ttggcacctt tgtgtgtggt accacctttg gcgcaccaat 180
 tgcagctacc gccgggtgaa atcttttcga catgtacgtg cactcacct actctggcac 240
 tgagaccgag 250

 <210> 60
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 60
 ggatccta atcactcact ataggggcag aatctcacct ttgagg 46

 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 61
 gttggagcta ccgacaaagg 20

 <210> 62
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 62
 ggcagaatct cacctttgag g 21

 <210> 63
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 63
 ggatcctaata acgactcact ataggggttg agctaccgac aaagg 45

 <210> 64
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 64
 ggcagaatct cacctttgag ggaacattca aggtgtggaa caacacatca agaaagatca 60
 acatcactgg tatgcagatg gtgccaaaga ttaacccatc aaaggccttt gtcggttagct 120
 ccaac 125

 <210> 65
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

 <400> 65
 gttggagcta ccgacaaagg cctttgatgg gttaatcttt ggcaccatct gcataccagt 60
 gatgttgatc tttcttgatg tgttggtcca caccttgaat gttccctcaa aggtgagatt 120
 ctgcc 125

 <210> 66
 <211> 925
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Khung AND tổng hợp để tạo thành hỗn hợp của bốn đoạn gen WSSV
 - VP28, VP19, rr2 and wsv477

 <400> 66
 gacagatatg gccaccacga ctaacactct tcctttcggc aggaccggag cccaggccgc 60
 tggctccttct tacaccatgg aagatcttga aggtccatg tctatggctc gcatgggtct 120
 ctttttgatc gttgctatct caattggtat cctcgtcctg gccgtcatga atgtatggat 180
 gggaccaaag aaggacagcg attctgacac tgataaggac accgatgatg atgacgacac 240

tgccaacgat aacgatgatg aggacaaata taagaacagg accagggata tgatgcttct 300
 ggctgggtcc gctcttctgt tcctcgtttc cgccgccacc gtttttatgt cttaccccaa 360
 gaggaggcag taaggcagaa tctcaccttt gagggaaacat tcaaggtgtg gaacaacaca 420
 tcaagaaaga tcaacatcac tggatgacag atggtgcca agattaacc atcaaaggcc 480
 tttgtcggtg gctccaacac ctctccttc acccccgctct ctattgatga ggatgaagtt 540
 ggcacctttg tgtgtggtac cacctttggc gcaccaattg cagctaccgc cgggtggaaat 600
 cttttcgaca tgtacgtgca cgtcacctac tctggcactg agaccgagct agaaaagcac 660
 tataatgtta ccaacccctt cccattcatg gacaatattt ccctcgagaa taagaccaac 720
 ttttttgaaa agagagtgcg cgagtatcaa cgtgcccagg tcatggcttc tatcaataag 780
 atcaagaagg accaacaaaac ccaagaaact ggttctcctc tccaattct gactgcaoct 840
 cctccagtct cttcctcatc atccgaacaa gaagatgttg aagacggcgt cggggactac 900
 atcagttatg acgattttat cagtt 925

<210> 67
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 67
 ataacgatga tgaggacaaa tataag 26

<210> 68
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 68
 ggatcctaatac gactcact ataggataac gatgatgagg acaaatataa g 51

<210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 69
 gttaccaacc ccttccatt c 21

<210> 70
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 70
 ggatcctaata acgactcact atagggttac caaccoccttc ccattc 46

<210> 71
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 71
 aatcgtcata actgatgtag tcc 23

<210> 72
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 72
 ggatcctaata acgactcact ataggaatcg tcataactga tgtagtcc 48

<210> 73
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 73
 ggatcctaata acgactcact atagggtatgg atactgcaac caagtgga 48

<210> 74
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 74
 ctcgaaaaca cgttccttaa acc 23

<210> 75
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 75
 tatggatact gcaaccaagt gga 23

<210> 76
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 76

ggatcctaatac gactcact ataggctcga aaacacgttc cttaaacc

40

<210> 77

<211> 250

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sản phẩm PCR dung hợp VP19-VP28

<400> 77

ataacgatga tgaggacaaa tataagaaca ggaccaggga tatgatgctt ctggctgggt 60

ccgctcttct gttcctcgtt tccgccgcca ccgtttttat gtcttacctt aagaggaggc 120

agtaaggcag aatctcacct ttgagggaac attcaagggtg tggaacaaca catcaagaaa 180

gatcaacatc actggtatgc agatgggtgcc aaagattaac ccatcaaagg cctttgtcgg 240

tagctccaac 250

<210> 78

<211> 250

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sản phẩm PCR Rr2

<400> 78

gttaccaacc ccttcccatt catggacaat atttccctcg agaataagac caactttttt 60

gaaaagagag tcgccgagta tcaacgtgcc caggctcatgg cttctatcaa taagatcaag 120

aaggaccaac aaacccaaga aactggttct cctctcccaa ttctgactgc acctcctcca 180

gtctcttcct catcatccga acaagaagat gttgaagacg gcgtcgggga ctacatcagt 240

tatgacgatt 250

<210> 79

<211> 250

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Sản phẩm PCR Wsv477

<400> 79

tatggatact gcaaccaagt ggatggctga aattattaga gagaagaggg gcaatattca 60

agaaataaaa gtgacctcta gagtagtctt caatggcaat ggttgtagtg catgtttctc 120

taacactaag agaaacttgt ataactttgg aacaaactat aacaatgttg tacattgtga 180

tttgttggtc ccttttgcaa ggcataggat tgtacatttc ttataatggt ttaaggaacg 240

tgttttcgag 250

<210> 80

<211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 80
 ggatcctaatacgcactcactataggtgggt aacaagattg atctggag

48

<210> 81
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Oligonucleotit ADN sợi đơn

<400> 81
 acataggatccattcaagg tgtggaacaa cac

33

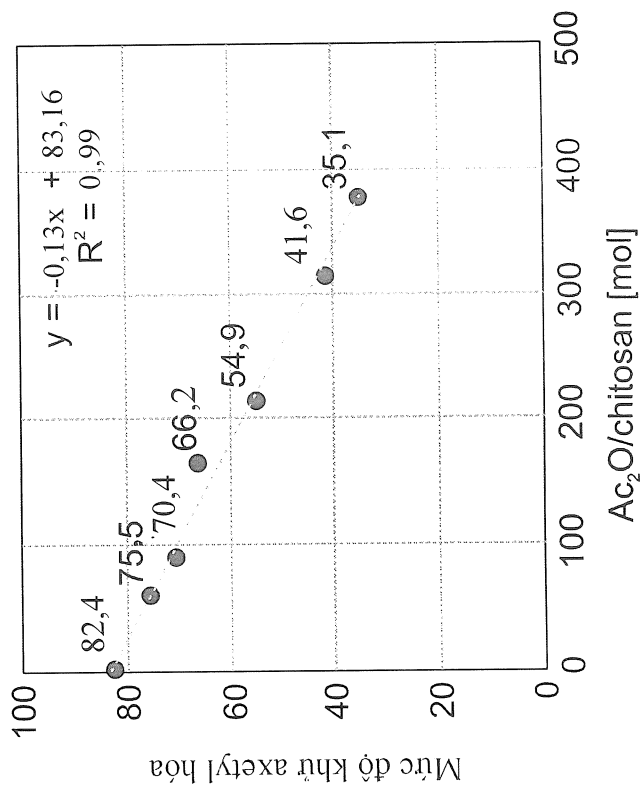
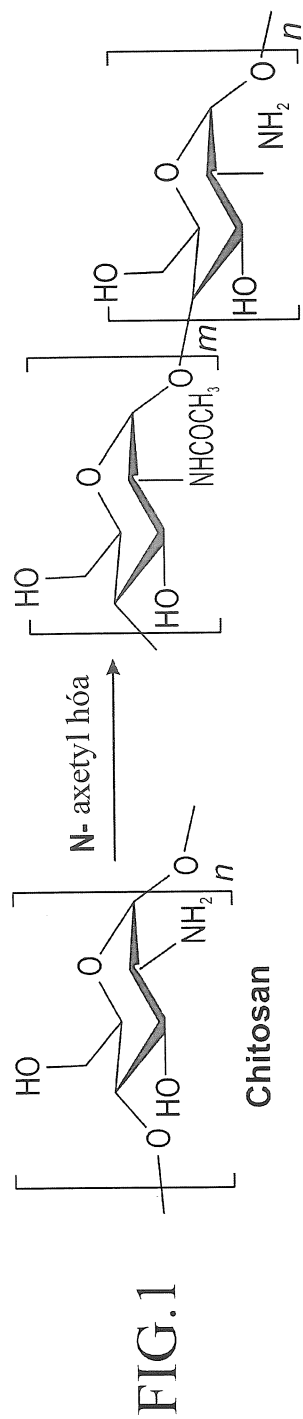


FIG.3A

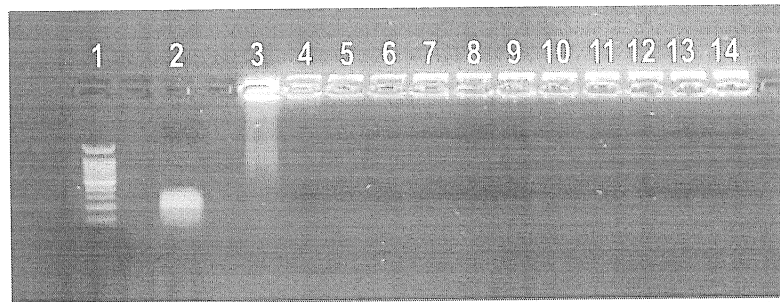


FIG.3B

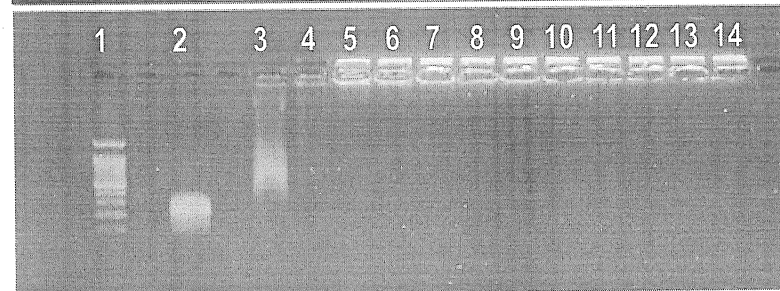


FIG.3C

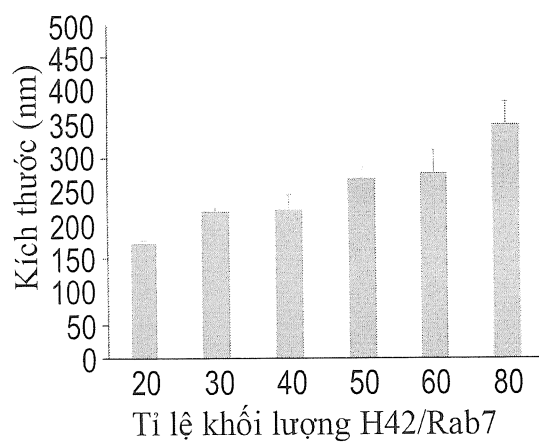
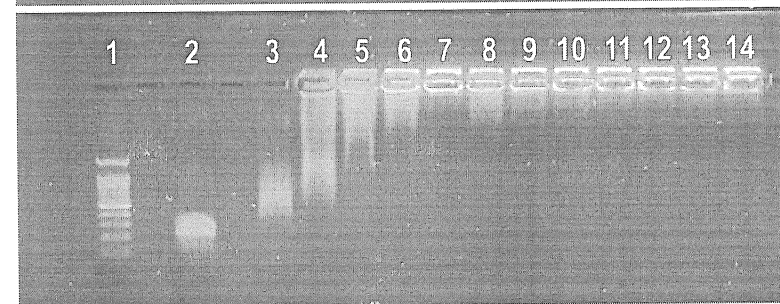


FIG.4A

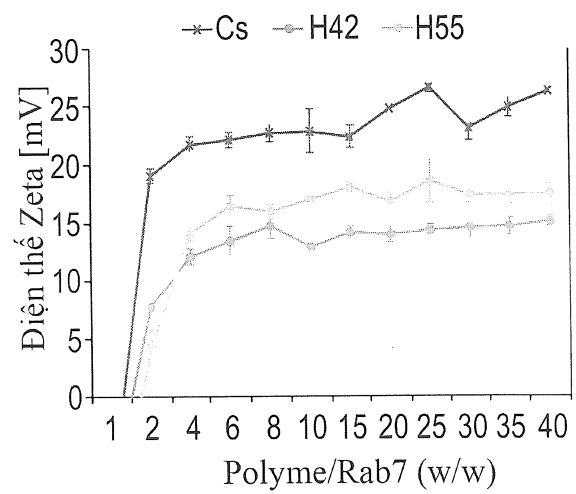


FIG.4B

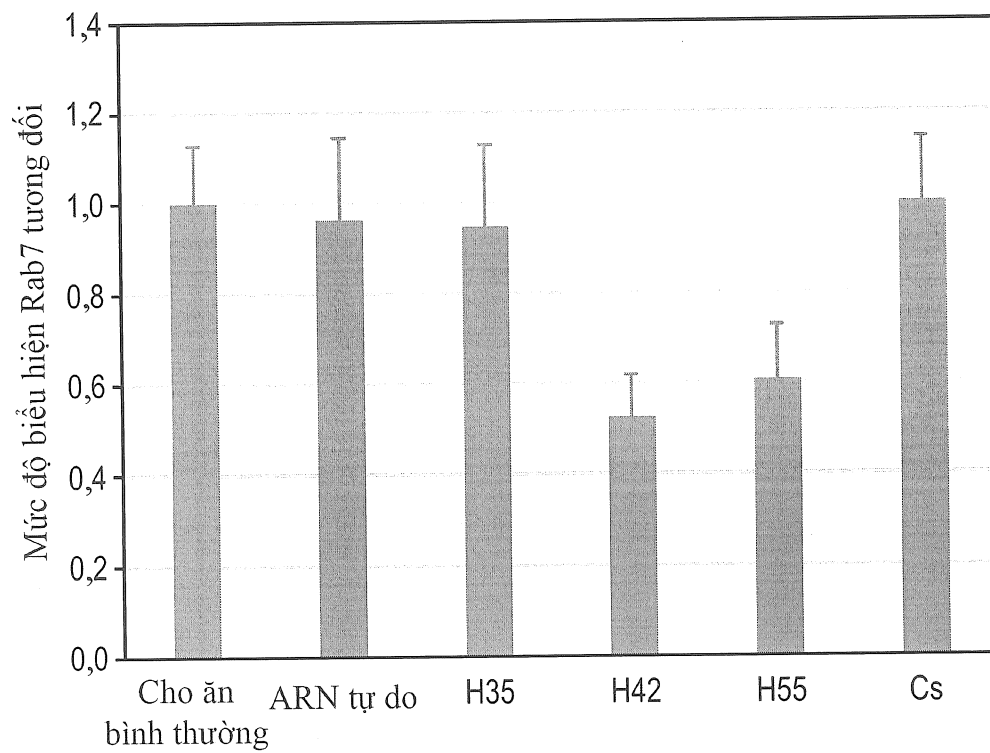


FIG.5

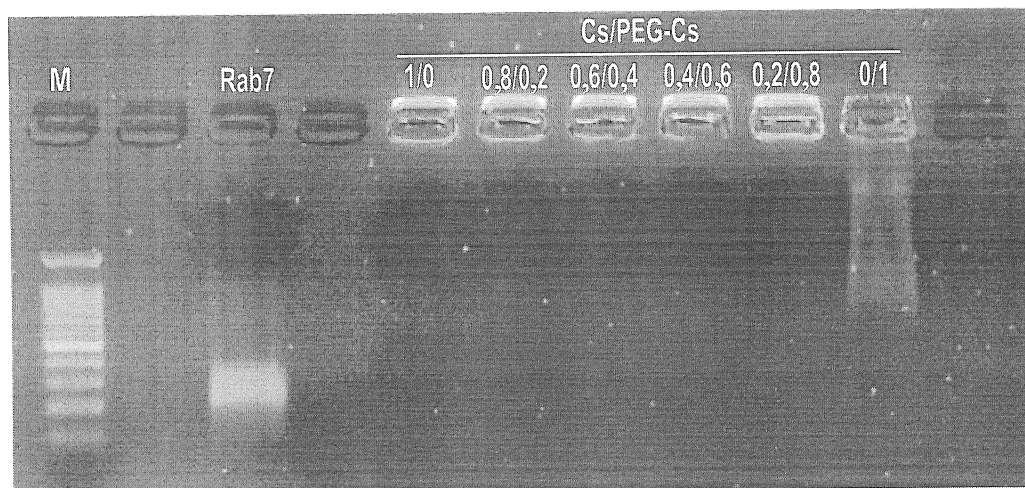
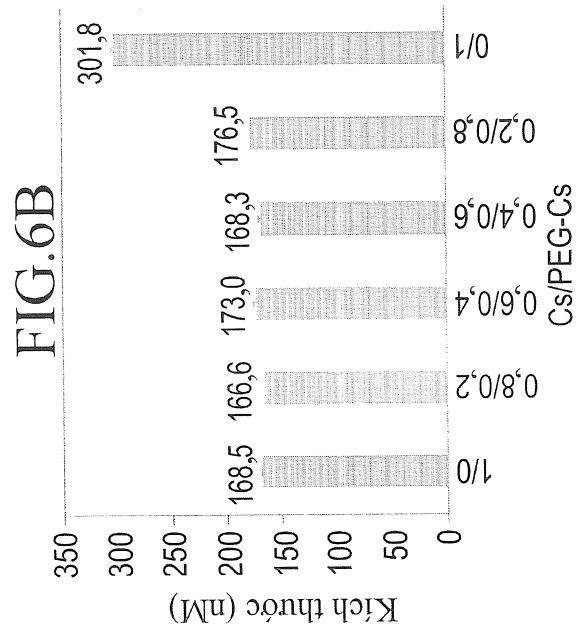
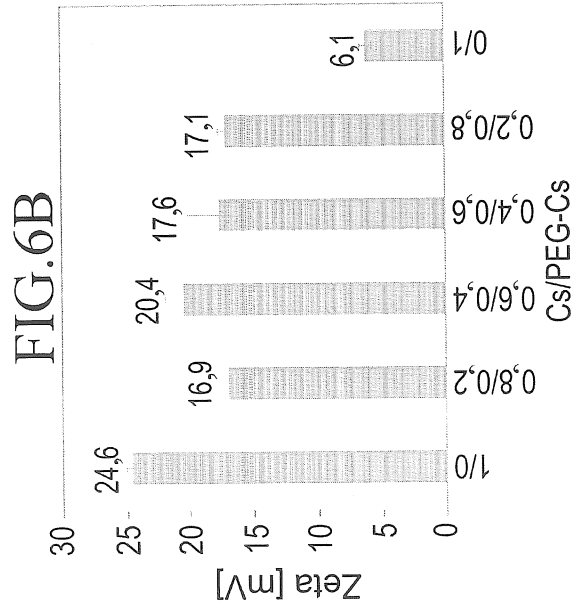
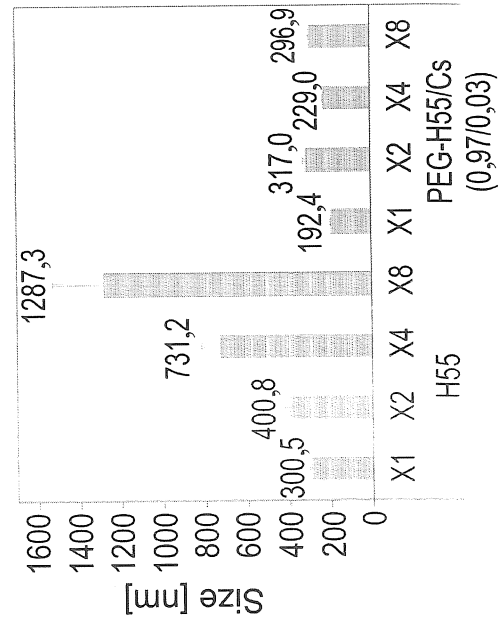
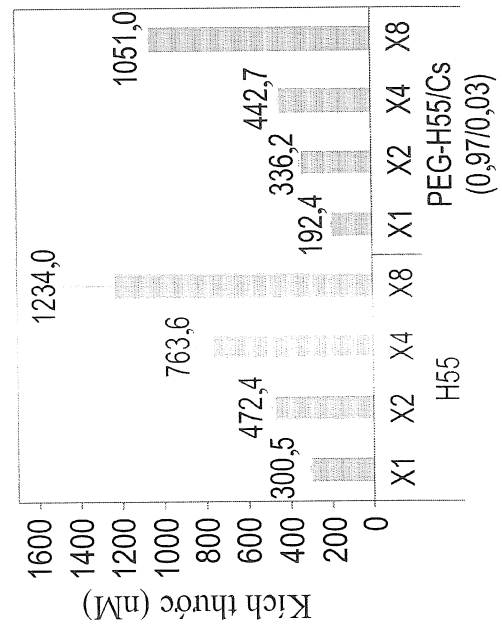


FIG.6

**FIG.7C****FIG.7A**

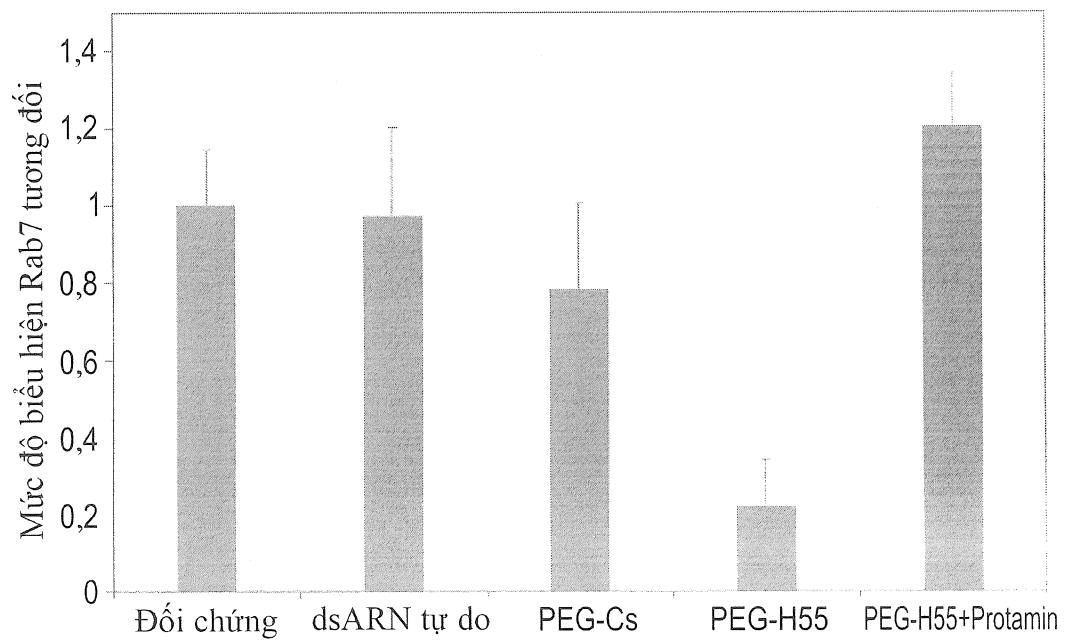


FIG.8

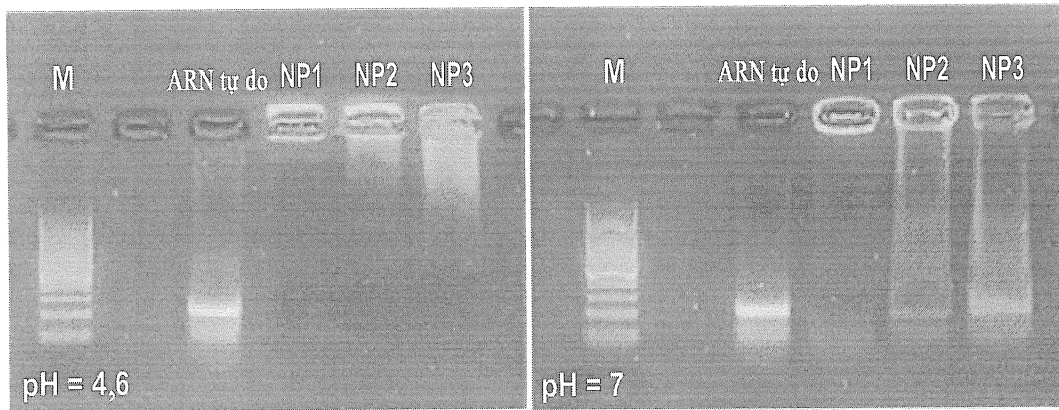


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

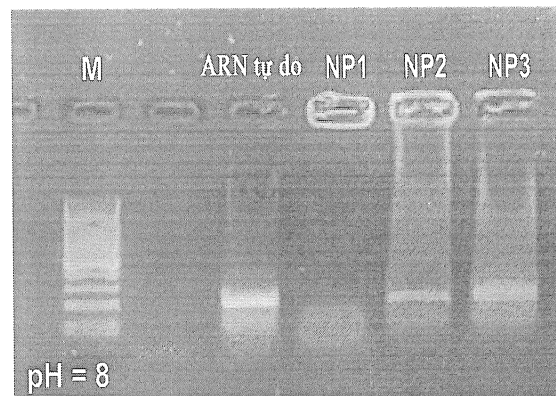


FIG. 9D

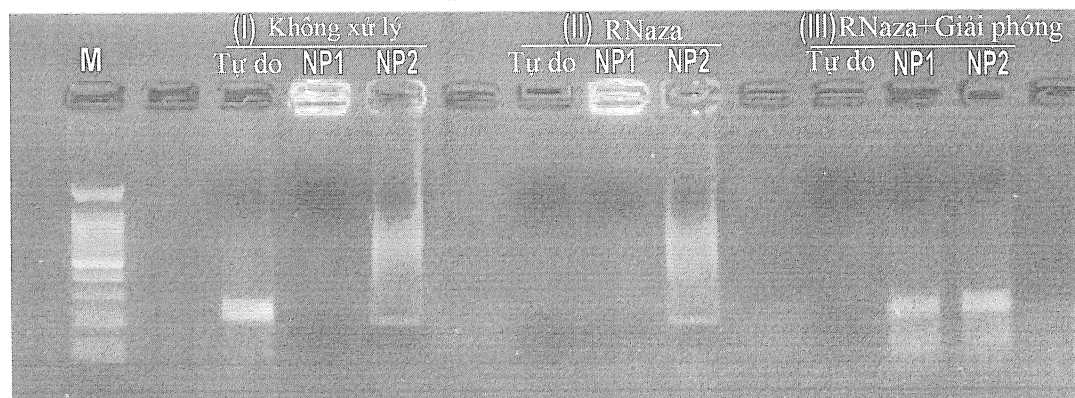
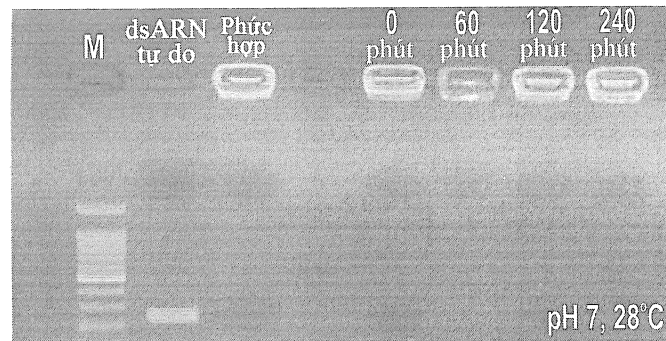


FIG. 10

7/10

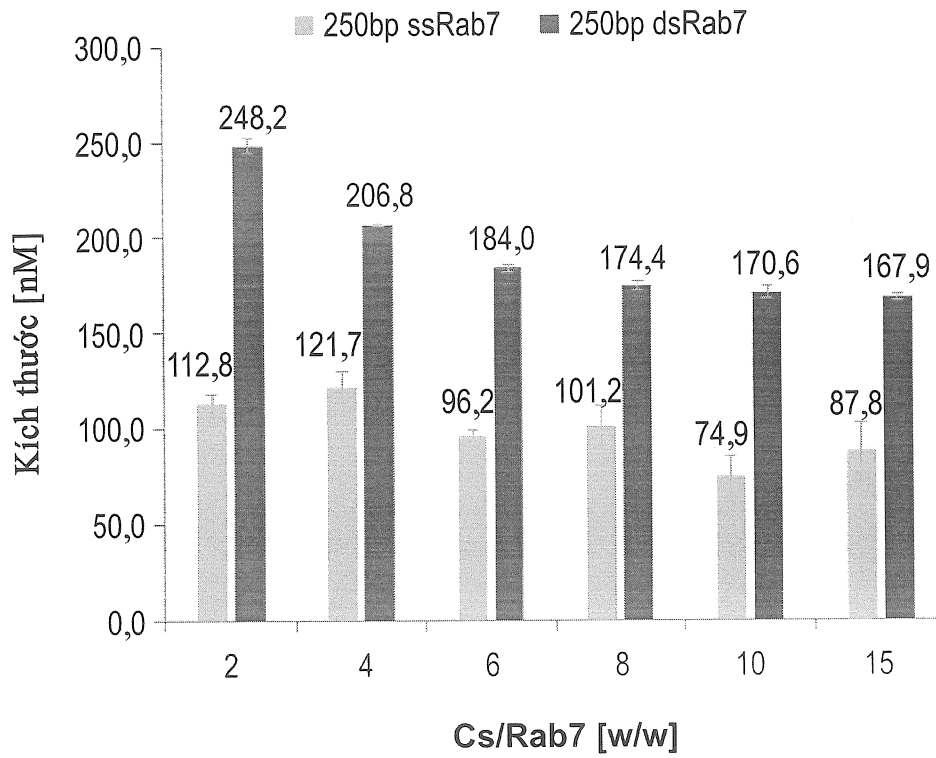


FIG.11

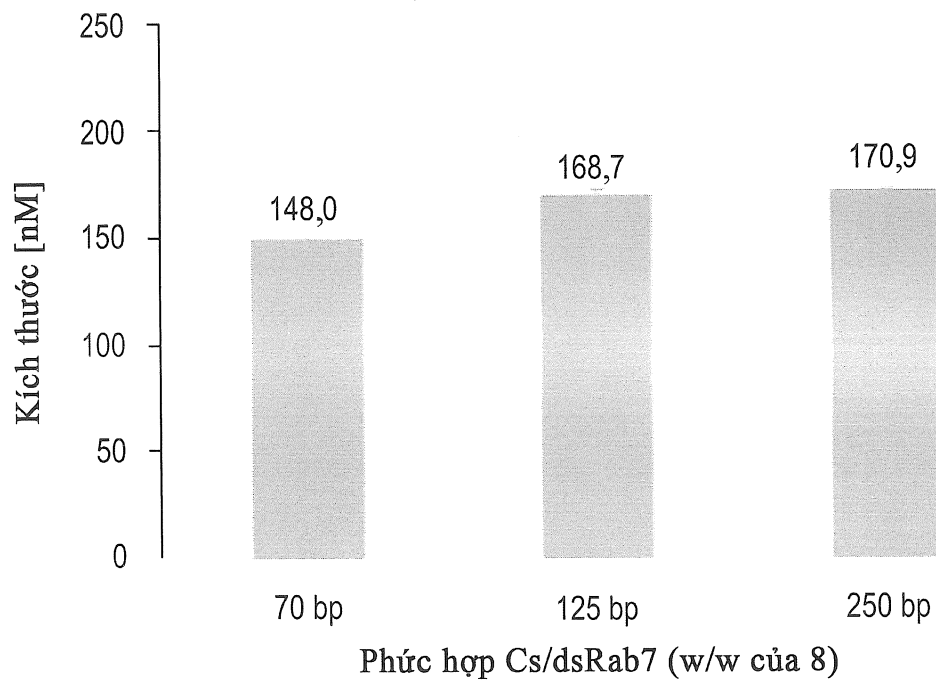


FIG.12

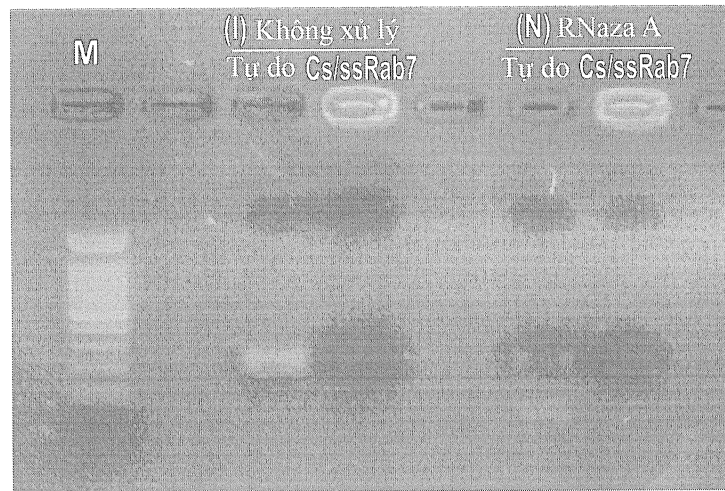


FIG.13

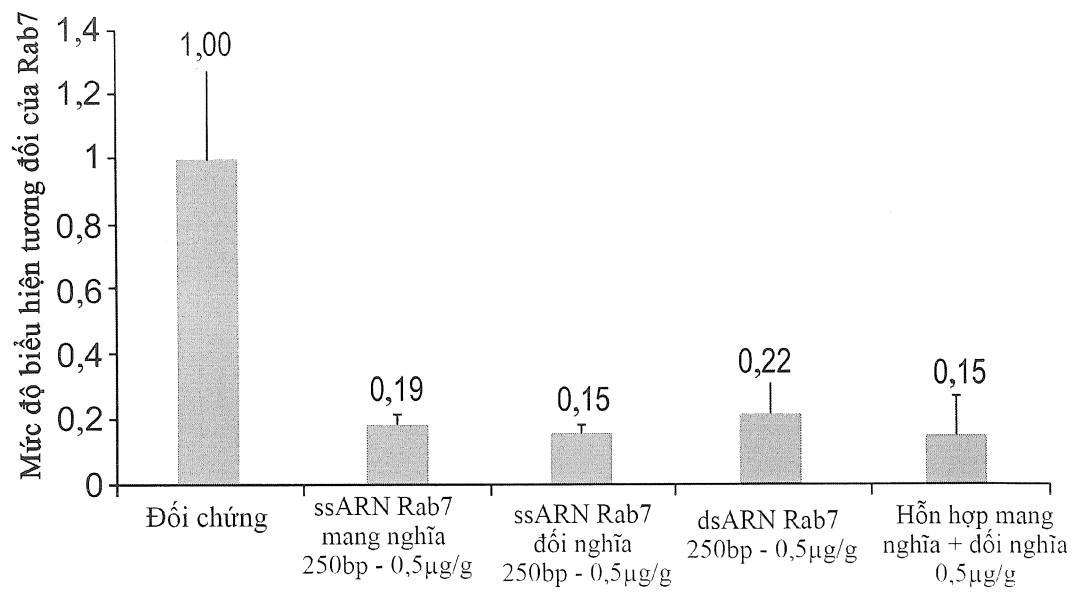


FIG.14

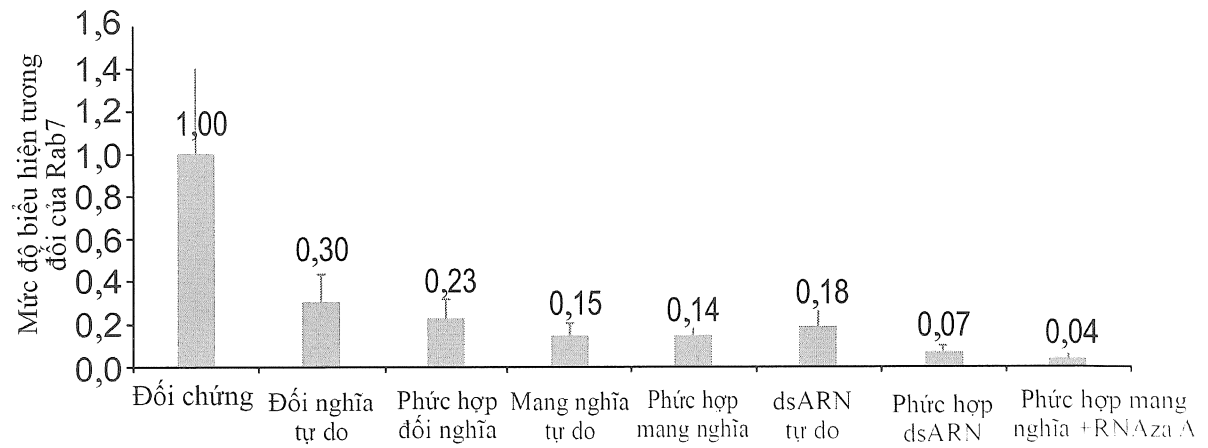


FIG.15

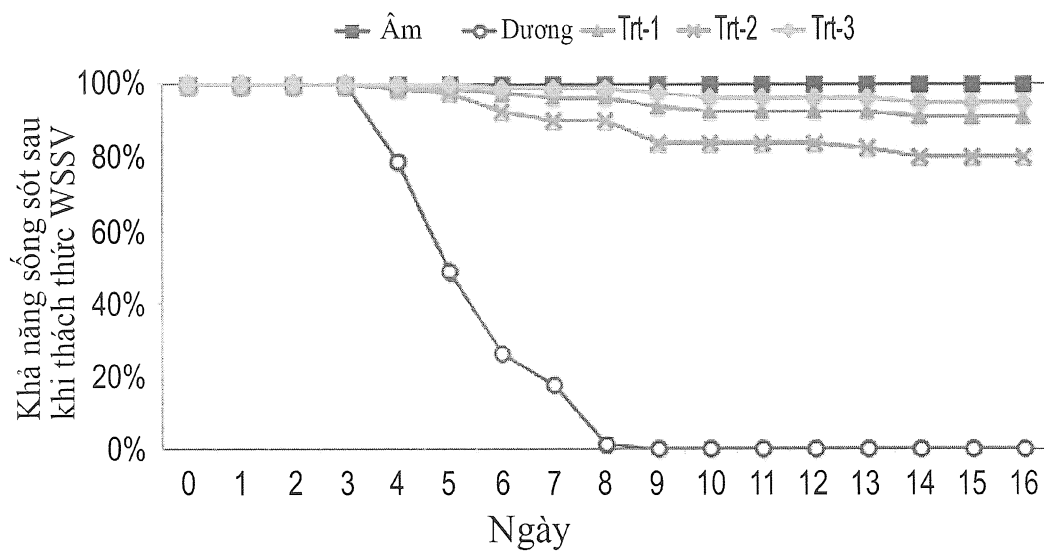


FIG.16

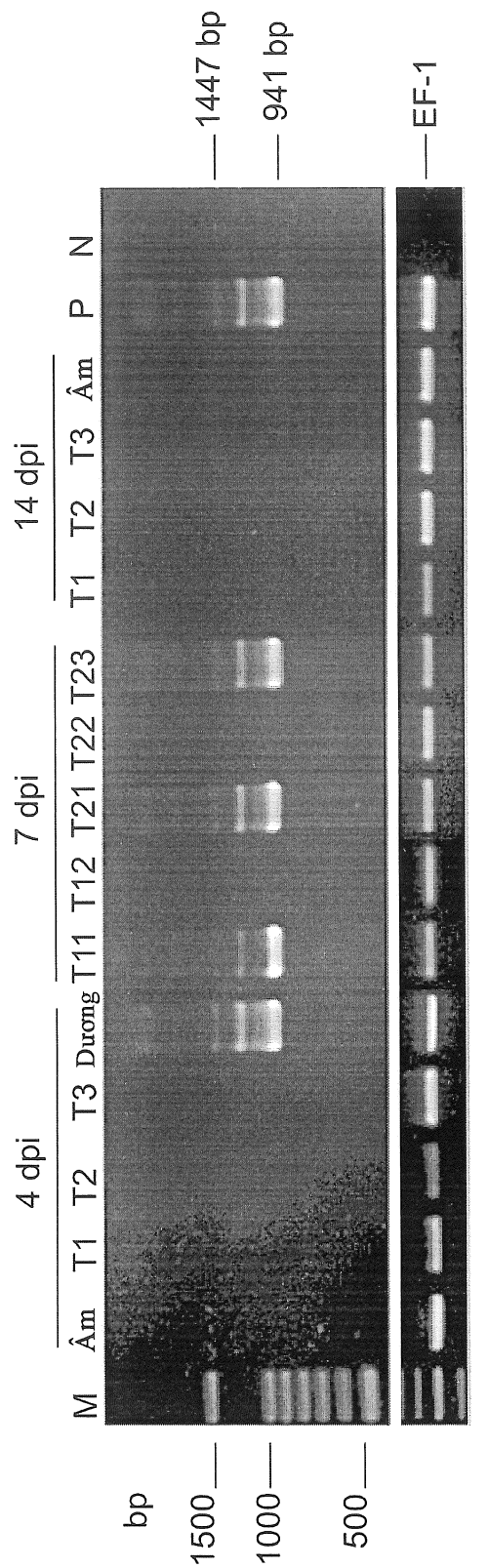


FIG.17