



(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) 
1-0022715

(51)⁷ **A23K 1/18**

(13) **B**

(21)	1-2012-01463	(22)	25.05.2012		
(30)	13/117,430	27.05.2011	US		
(45)	27.01.2020	382	(43)	25.12.2012	297
(73)	National Cheng Kung University (TW) No.1, University Road, Tainan City, Taiwan				
(72)	Chen, Tzong-Yueh (TW), Huang, Yi-Ling (TW)				
(74)	Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)				

(54) **CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT CÓ XƯƠNG SỐNG**

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm thức ăn cho động vật có xương sống chứa protein tiết có tính axit và giàu xystein, một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein, kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu xystein, hoặc kháng thể kháng một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình nuôi trồng, và cụ thể hơn là đến chế phẩm thức ăn cho động vật có xương sống.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cùng với sự tăng nhanh của dân số thế giới và sự giảm diện tích đất trồng trọt, các nguồn thức ăn sẵn có trở nên ngày càng thiếu hụt và việc cải thiện sản lượng cho mỗi đơn vị diện tích và gia tăng giá trị dinh dưỡng bổ sung là các xu hướng trong sản xuất thức ăn trên thế giới.

Như với ngành đánh bắt cá, vì sản lượng cá thu được từ việc đánh bắt cá từ biển gần như đã bão hòa, và nhu cầu về các sản phẩm cá trên thị trường protein động vật gia tăng hàng ngày, nên cần phải bổ sung lượng thiếu hụt trong cung cấp sản phẩm từ ngành đánh bắt cá bằng nghề nuôi trồng thủy sản.

Epinephelus spp. là một loại cá nước ấm thuộc *Epinephelus*, *Epinephelinae*, *Serranida*, *Perciforms*, *Osteichthyes*, được phân bố rộng rãi trong các vùng nước nhiệt đới và cận nhiệt đới trên thế giới, và thường được biết là loài cá có giá trị kinh tế quan trọng nhất ở vùng Châu Á và Thái Bình Dương bởi ngành đánh bắt cá. Ở Đài Loan, việc nuôi cá chủ yếu là *Epinephelus malabaricus*, *Epinephelus coioides*, *Epinephelus lanceolatus* và *Epinephelus fario*. Nói chung, *Epinephelus* spp. phải được nuôi trong ít nhất từ 8 đến 12 tháng trước khi bán; tuy nhiên, sản lượng cuối cùng là không cao. Ngoài tình trạng chết sớm của cá non do nhiễm virus và vi khuẩn, ví dụ như, các yếu tố thời tiết, các vấn đề ô nhiễm nguồn nước, thì việc lựa chọn các sinh vật làm thức ăn và quản lý trong quá trình nuôi trồng sẽ làm tăng nguy cơ cho người nuôi. Do đó, làm thế nào để cải thiện tốc độ phát triển của việc nuôi cá, rút ngắn thời gian nuôi trước khi bán, và giảm tỉ lệ chuyển hóa thức ăn (khối lượng thức ăn ăn vào/mức tăng khối lượng cơ thể của cơ thể cá) và các nguy cơ tiềm ẩn trong quá trình nuôi đã trở thành hướng nghiên cứu có giá trị.

Protein tiết có tính axit và giàu xystein (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine: SPARC), còn được gọi là osteonectin hoặc BM40 với kích thước protein là khoảng 35-45kDa và chủ yếu được phân bố trong chất nền ngoại bào (extracellular matrix: ECM), là protein nền ngoại bào, và cũng là glycoprotein đa chức năng có đặc tính liên kết với ECM hoặc tế bào.

Mặc dù SPARC chủ yếu được phân bố trong ECM, song chức năng của SPARC khác với protein cấu trúc thông thường trong chất nền mà chịu trách nhiệm về việc tạo cấu trúc và hỗ trợ cho tế bào; ngược lại, SPARC chuyên đóng vai trò là cầu nối tế bào và ECM, và là protein điều hòa có khả năng điều hòa sự sản xuất, dự trữ và tích lũy một số loại protein nền tế bào (Bradshaw and Sage, 2001, *J Clin Invest* 107; 1049-1054; Lane and Sage, 1994, *FASEB J* 8; 163-173). Tuy nhiên, SPARC, chủ yếu được biểu hiện trong quá trình phát triển phôi, có ảnh hưởng lớn đến sự biệt hóa tế bào, canxi hóa và tạo mô, phát triển xương, tạo hình thái và phát triển cơ quan. Mức độ biểu hiện của protein này ở sinh vật trưởng thành có xu hướng bị giảm, vì sự biểu hiện rõ ràng chủ yếu xảy ra trong quá trình phục hồi và tái tổ chức da hoặc mô bị tổn thương (Lane and Sage, 1994).

SPARC có thể được chia chủ yếu thành 3 vùng chức năng (Hohenester et al., 1997, *EMBO J* 16; 3778-3786): 1. vùng axit ở đầu tận cùng N của protein này, có khả năng liên kết với 5-8 ion canxi với ái lực yếu và có các chức năng ức chế sự mở rộng tế bào và điều hòa sự tổng hợp ECM; 2. vùng tương tự Follistatin, bao gồm nhiều xystein, có chức năng giống như follistatin, và có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào, và bao gồm thêm trình tự đặc hiệu khác, nghĩa là trình tự liên kết ion đồng (K) GHK (Iruela-Arispe et al., 1995, *Mol Biol Cell* 6; 327-343), và có chức năng thúc đẩy sự tăng sinh mạch; và 3. vùng gắn ion canxi ngoại bào (vùng EC), nằm ở đầu tận cùng C của SPARC, có 2 motif bàn tay-EF, có khả năng liên kết với các ion canxi với ái lực cao và có khả năng liên kết với tế bào hoặc một số collagen, và có thêm tác dụng ức chế sự tăng sinh và mở rộng tế bào (Maurer et al., 1995, *J Mol Biol* 253; 347-357).

Hiện nay, một số kết quả đã đạt được thông qua các nghiên cứu và thảo

luận về các chức năng sinh học của SPARC, và một số đặc tính đã được phát hiện ra nhờ quan sát sự nuôi cấy tế bào nội mô của chuột trên in vitro: (I) sự biểu hiện SPARC có thể ức chế sự mở rộng hình thái tế bào để làm cho tế bào gần như tròn (Murphy-Ullrich et al., 1991, *J Cell Biol* 115; 1127-1136); điều hòa thành phần của ECM và sự biểu hiện của một số protein ECM, để điều chỉnh sự liên kết của tế bào với chất nền ngoại bào để thay đổi hình thái tế bào và khả năng di cư (Hasselaar et al., 1991, *J Biol Chem* 266; 13178-13184; and Tremble et al., 1993, *J Cell Biol* 121; 1433-1444); (II) ức chế chuỗi chu kỳ tế bào, để chặn chu kỳ ở giữa pha G1, và do đó có chức năng ức chế sự phát triển tế bào (Yan and Sage, 1999, *J Histochem Cytochem* 47; 1495-1506); (III) được phát hiện ra trong các nghiên cứu về nuôi cấy tế bào mạch mà các tế bào nội mô có đặc tính thúc đẩy tăng sinh mạch (Funk and Sage, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88; 2648-2652). Trên in vivo, đã phát hiện ra rằng chuột có gen SPARC bị bất hoạt bị nhiễm bệnh đục thủy tinh thể không lâu sau khi sinh ra, và do đó được công nhận là SPARC là protein thiết yếu cho sự phát triển thủy tinh thể của mắt (Yan and Sage, 1999). Cũng được phát hiện ra qua các nghiên cứu là ở chuột có gen *sparc* bị bất hoạt, các thay đổi bất thường về cấu trúc da, lớp mỡ dày, sự gia tăng thể tích và số lượng tế bào mỡ, và sự tăng nồng độ leptin được tiết bởi các tế bào mỡ trong máu được quan sát thấy, và do đó được công nhận là protein SPARC có mối liên quan với sự điều hòa in vivo các thay đổi về lượng mỡ trong cơ thể (Bradshaw et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100; 6045-6050).

Myostatin, còn được gọi là yếu tố biệt hóa và phát triển-8 (GDF-8), là thành viên của họ yếu tố phát triển biến nạp TGF- β . Myostatin có thể điều hòa âm sự phát triển và biệt hóa cơ. Qua các nghiên cứu trên cơ thể bò và người đã phát hiện thấy rằng khi chức năng của myostatin bị mất, vì tác dụng điều hòa âm sự phát triển và biệt hóa cơ không thể có hiệu quả, nên kiểu hình của sự tăng cơ xảy ra (McPherron and Lee, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12457-12461; and Schuelke et al, 2004, *The New England Journal of Medicine* 350, 2682-2688). Trong các nghiên cứu trên động vật có vú, myostatin ở chuột bị bất hoạt (McPherron and Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94; 12457-12461), sự

biểu hiện mức độ cao của protein ức chế myostatin (ví dụ như, follistatin) trong cơ của chuột hoặc làm mất chức năng của protein thụ thể ActRIIB cần thiết cho việc truyền tín hiệu (Lee and McPherron, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98; 9306-9311) dẫn đến việc xuất hiện sự gia tăng cơ. Trong các nghiên cứu trên cá nhiều xương, công nghệ bất hoạt morpholino đối nghĩa được sử dụng để ức chế ARN thông tin của myostatin-1 trong phôi của cá vằn, nhờ đó thúc đẩy sự phát triển phôi (Amali et al, 2004, *Developmental Dynamics* 229; 847-856); hoặc công nghệ ARNi được sử dụng để làm câm myostatin-1 ở cá vằn, và do đó các đặc điểm của cá vằn khổng lồ xuất hiện (Acosta et al, 2005, *Journal of Biotechnology* 119; 324-331). Các tế bào cơ được nghiên cứu thêm với lát cắt mô, và đã phát hiện ra rằng sự phình thể tích và sự tăng sản số lượng tế bào cơ có thể là các nguyên nhân gây ra sự cơ bắp.

Mặt khác, được chỉ ra trong các nghiên cứu dòng tế bào in-vitro là, nếu myostatin được biểu hiện trong dòng nguyên bào cơ C2C12 ở mức độ cao, thì sự tăng sinh của nguyên bào cơ có thể bị ức chế, để chặn tế bào này trong pha G đến pha S trong chu kỳ tế bào (Thomas et al, 2000, *The Journal of Biological Chemistry* 275; 40235-40243). Mặt khác, nếu myostatin được biểu hiện trong tế bào hình sao cơ ở mức độ cao, đã phát hiện ra rằng myostatin có thể ức chế sự hoạt hóa và tự tái tạo của tế bào hình sao cơ (McCroskery, 2003, *The Journal of Cell Biology* 162; 1135-1147), điều này cũng chứng minh là myostatin đóng vai trò điều hòa âm trong sự phát triển cơ. Ngoài việc điều hòa tế bào cơ, được chỉ ra trong các tài liệu khác là myostatin có chức năng ức chế sự tạo mỡ (Rebbapragada et al, 2003, *Molecular and Cellular Biology* 23; 7230-7242), và cũng được chỉ ra trong các nghiên cứu là myostatin có chức năng ức chế sự chết theo chương trình của nguyên bào cơ (Ríos et al, 2001, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280; 561-566).

Tuy nhiên, trong các nghiên cứu về myostatin và SPARC, không có báo cáo nào về tỉ lệ chuyển hóa thức ăn (khối lượng thức ăn ăn vào/mức tăng của khối lượng cơ thể), tỉ lệ này cũng là quan trọng để kiểm soát chi phí trong công nghiệp nuôi trồng, ngoài việc đạt được lượng cơ. Ngoài ra, quy trình thông thường để gây miễn dịch động vật có xương sống là tiêm epitop, quy trình này

mất thời gian và công sức, và động vật có xương sống này dễ bị đau đớn. Do đó, chế phẩm thức ăn để làm giảm tỉ lệ chuyển hóa thức ăn vẫn cần thiết được phát triển trong ngành công nghiệp này để cải thiện tốc độ phát triển nuôi trồng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm chăn nuôi cho động vật có xương sống, để cải thiện tốc độ phát triển nuôi trồng, rút ngắn thời gian nuôi trồng trước khi bán, và làm giảm tỉ lệ chuyển hóa thức ăn và các nguy cơ tiềm ẩn trong quá trình nuôi trồng.

Sáng chế đề xuất chế phẩm chăn nuôi cho động vật có xương sống, chứa protein tiết có tính axit và giàu xystein, một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein, và kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu xystein, hoặc kháng thể kháng một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein.

Tốt hơn, nếu chế phẩm thức ăn theo sáng chế chứa thêm myostatin, một đoạn của myostatin, kháng thể kháng myostatin, hoặc kháng thể kháng một đoạn của myostatin.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hiệu giá kháng thể trong huyết thanh của cá mú bị ức chế miễn dịch protein tiết có tính axit và giàu xystein (secreted protein acidic and rich in cystein-SPARC).

Fig.2 thể hiện sự thay đổi khối lượng của cá mú bị ức chế miễn dịch protein tiết có tính axit và giàu xystein.

Fig.3 thể hiện hiệu giá kháng thể trong huyết thanh của cá mú bị ức chế miễn dịch myostatin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chế phẩm thức ăn cho động vật có xương sống, chứa protein tiết có tính axit và giàu xystein, một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein, kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu xystein, hoặc

kháng thể kháng một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein.

Chế phẩm thức ăn theo sáng chế làm giảm tỉ lệ chuyển hóa thức ăn ở động vật có xương sống bằng cách ức chế chức năng của protein tiết có tính axit và giàu xystein.

Tốt hơn, nếu chế phẩm thức ăn theo sáng chế chứa thêm myostatin, một đoạn của myostatin, kháng thể kháng myostatin, hoặc kháng thể kháng một đoạn của myostatin.

Chế phẩm thức ăn theo sáng chế là thích hợp cho động vật có xương sống. Tốt hơn nếu chế phẩm thức ăn theo sáng chế là thích hợp cho cá, và tốt hơn nữa, nếu cá này thuộc *Osteichthyes*, hiện nay myostatin của cá bao gồm *Danio rerio*, cá hồi Đại Tây Dương, *Mozambique tilapia*, *Morone saxatilis*, *Sparus aurata*, *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Silurus asotus*, *Epinephelus coioides* và *Lateolabrax japonicus* đã được tách dòng, và trình tự axit amin có sự bảo toàn cao, và do đó được công nhận là các myostatin có cùng một chức năng; cụ thể hơn, tốt hơn là cá này thuộc *Perciforms*, *Osteichthyes*; đặc biệt tốt hơn nếu cá này thuộc *Serranidae*, *Perciforms*, *Osteichthyes*; đặc biệt tốt hơn nếu cá này thuộc *Epinephelinae*, *Serranidae*, *Perciforms*, *Osteichthyes*; đặc biệt tốt hơn nếu cá này thuộc *Epinephelus*, *Epinephelinae*, *Serranidae*, *Perciforms*, *Osteichthyes*; và tốt nhất, nếu cá này là *Epinephelus coioides*.

Chế phẩm thức ăn theo sáng chế là để cải thiện tỉ lệ chuyển hóa thức ăn ở động vật có xương sống bằng cách ức chế chức năng của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin ở các giai đoạn của, ví dụ như, gen, phiên mã, dịch mã, hoạt tính protein và con đường truyền tín hiệu. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể lựa chọn thao tác thích hợp để ức chế chức năng của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, ví dụ như, hoạt tính của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin tự bị ức chế hoặc chức năng của protein thụ thể bị ức chế. Tốt hơn, nếu chức năng của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin bị ức chế bằng phương pháp ức chế miễn dịch, trong đó hoạt tính protein này bị ức chế, và gây ra tác dụng phụ toàn thân nhỏ trên động vật có xương sống.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, phương pháp ức chế miễn dịch là sử dụng protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, và kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, hoặc kháng thể kháng một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin cho động vật có xương sống. Tốt hơn, nếu một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin là epitop. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể tách dòng và thu được gen mã hóa protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, để biểu hiện protein này hoặc epitop của nó, và gây miễn dịch protein này hoặc epitop của nó vào cơ thể động vật, nhờ đó thu được kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc kháng thể kháng myostatin hoặc kháng thể của epitop của chúng. Kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách gây miễn dịch protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin hoặc epitop của chúng vào các động vật khác, và tinh chế, hoặc bằng cách gây miễn dịch trực tiếp protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin hoặc epitop của chúng vào cơ thể động vật có xương sống, nhờ đó cho phép cơ thể động vật có xương sống tự tạo ra kháng thể. Kháng thể theo sáng chế có thể là kháng thể đa dòng hoặc kháng thể đơn dòng và tốt hơn, nếu kháng thể này là kháng thể đa dòng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop" dùng để chỉ đoạn có khả năng gây ra phản ứng miễn dịch để tạo ra kháng nguyên trong kháng nguyên protein, kháng nguyên này có thể thu được bằng cách dự đoán cấu trúc hoặc bằng cách lựa chọn đoạn protein để quan sát phản ứng miễn dịch ở động vật được gây miễn dịch.

Myostatin tương đồng cao với các thành viên khác trong họ TGF- β về trình tự, và bao gồm 3 phần: (1) vùng kỵ nước ở đầu tận cùng N, như tín hiệu được giải phóng từ quá trình tiết protein; (2) vị trí phân cắt protein được bảo toàn cao RXRR (SEQ ID NO. 2); (3) vùng hoạt động ở đầu tận cùng C giàu xystein (Sharma et al, 1999, Journal of cellular physiology 180; 1-9). Được chứng minh trong nhiều báo cáo là trình tự axit amin của myostatin ở động vật

có xương sống có sự bảo toàn cao ở vùng hoạt động ở đầu tận cùng C (McPherron et al, 1997, Nature 387; 83-90). Hiện nay, kháng thể đơn dòng JA16 có tính đặc hiệu cao với myostatin trong nghiên cứu trên myostatin (Whittemore et al, 2003, Biochemical and Biophysical Research Communications 300; 965-971), đã phát hiện ra bằng cách phân tích vị trí liên kết với myostatin mà vị trí liên kết này nằm ở 15 axit amin DFGLDCDEHSTESRC (SEQ ID NO. 1) ở đầu tận cùng C của myostatin của chuột, và vì vậy có thể được biết là vùng ở đầu tận cùng C là đoạn có tính kháng nguyên. Do đó, tốt hơn, nếu đoạn có tính kháng nguyên của myostatin là vùng ở đầu tận cùng C của myostatin; và tốt hơn, nếu vùng ở đầu tận cùng C của myostatin có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO. 1.

Mặt khác, vì epitop này là đoạn peptit nhỏ, nếu kháng nguyên đoạn nhỏ được gây miễn dịch trực tiếp vào động vật, đáp ứng miễn dịch có thể không thỏa mãn. Được ưu tiên là tạo ra epitop chuỗi tuyến tính (linear array epitope: LAE) chứa các đơn vị lặp lại kế tiếp, để cải thiện phản ứng miễn dịch. Thêm vào đó, độc tố vi khuẩn có thể được sử dụng để hỗ trợ cho sự phân phối kháng nguyên, bằng cách sử dụng độc tố đã bị khử hoạt tính độc làm hệ vận chuyển, và nhờ đó tác dụng miễn dịch toàn diện bằng cách sử dụng các đặc tính của độc tố này. Tốt hơn, nếu LAE theo sáng chế được dung hợp với vùng chức năng Ia của ngoại độc tố A *Pseudomonas* (PE). Ngoại độc tố *Pseudomonas* có khối lượng phân tử là 66kDa và chứa 613 axit amin, và cấu trúc protein chủ yếu bao gồm 3 vùng, và vùng Ia (các axit amin 1-252) là vùng liên kết thụ thể và chịu trách nhiệm liên kết với α 2-macroglobulin/thụ thể lipoprotein tỷ trọng thấp (low density lipoprotein receptor: LDLR) trên màng tế bào của tế bào động vật có vú, và sau đó xâm nhập vào hệ thống nội màng của tế bào bằng quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể. Được chứng minh là ngoại độc tố A *Pseudomonas* có khả năng làm tăng hiệu quả đáp ứng miễn dịch được kích thích (Donnelly et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90; 3530-3534).

Theo một phương án được ưu tiên hơn theo sáng chế, protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu

xystein và/hoặc myostatin, hoặc kháng thể kháng một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin được đóng nang sinh học trong tôm. Tôm thường được sử dụng làm thức ăn để dễ dàng sử dụng cho cá. Tốt hơn, nếu tôm này là ấu trùng; tốt hơn nữa, nếu ấu trùng này được làm đông khô thành bột.

Theo một phương án được ưu tiên khác theo sáng chế, protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, kháng thể kháng protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin, hoặc kháng thể kháng một đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein và/hoặc myostatin được biểu hiện trong vi sinh vật, và vi sinh vật này có thể được bổ sung vào chế phẩm này, chẳng hạn như được đóng nang trong tôm. Tốt hơn, nếu môi trường nuôi cấy vi sinh vật này được làm đông khô thành bột. Theo một phương án khác, vi sinh vật này là *Escherichia coli*.

Theo một phương án được ưu tiên theo sáng chế, việc ức chế miễn dịch chức năng của protein tiết có tính axit và giàu xystein là hữu hiệu trong việc làm giảm tỉ lệ chuyển hóa thức ăn xuống hơn 5% so với nhóm đối chứng; tốt hơn, nếu mức giảm nằm trong khoảng từ 8% đến 40%.

Các ví dụ sau đây được đưa ra chỉ với mục đích minh họa mà không dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Ức chế miễn dịch protein tiết có tính axit và giàu xystein (SPARC):

Bào chế kháng nguyên:

Tổng số 48 *Epinephelus coioides* có khối lượng trung bình là 70 ± 10 g và chiều dài trung bình là từ 5 đến 6 inso được sử dụng trong nhóm đối chứng và các nhóm thử nghiệm, và thời gian thử nghiệm là 5 tháng. Kháng nguyên được tạo ra bằng cách khuếch đại gen *sparc* bằng cách sử dụng đoạn mồi 1 (SEQ ID NO. 3) và đoạn mồi 2 (SEQ ID NO. 4).

Quy trình nuôi cấy lên men 35l được tạo ra, để nuôi cấy chủng *E. coli* BL21(DE3) chứa epitop trong thùng lên men có dung tích 50l. 4 ống chứa 5ml chủng vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm bằng môi trường LB/ampixilin ở 37°C được cấy lần lượt vào môi trường 0,2l LB/ampixilin và toàn bộ 1l được lắc và nuôi cấy ở 37°C đến OD₆₀₀ là 0,3, và sau đó bổ sung vào 35l môi trường để nuôi cấy và lấy mẫu để xác định OD₆₀₀ mỗi giờ để theo dõi các thay đổi về đường cong phát triển. Các thời điểm thích hợp được chọn theo đường cong phát triển, IPTG có nồng độ cuối cùng là 0,1mM được bổ sung vào để kích thích *E. coli* biểu hiện protein dung hợp ở mức độ cao, lắc và nuôi cấy ở 37°C trong 3 giờ, và ly tâm để thu hồi vi khuẩn. Sự biểu hiện của protein dung hợp được xác định bằng SDS-PAGE và thẩm tách Tây, để xác định các điều kiện lên men trong 35l tối ưu.

Bào chế vacxin dùng qua đường miệng chứa *Artemia salina* L. được đóng nang sinh học

Ủ *Artemia salina* L.: 4g trứng khô của *Artemia salina* L. được cân, cho vào cốc có mỏ 250ml, và ngâm trong 150ml nước sạch đã bổ sung trong 0,5 giờ. Trứng nghỉ của *Artemia salina* L. được lọc bằng màng và được rửa bằng lượng nước sạch thích hợp. Trứng nghỉ của *Artemia salina* L. được bổ sung vào 5l dung dịch ủ, và được phân bố đồng nhất. Đá bọt được đặt vào và bắt đầu bơm khí, và thể tích hấp thu khí được điều chỉnh đến khoảng 500cm³/phút (để duy trì oxy hòa tan cao hơn 2ppm). Thiết bị chiếu sáng được bật lên, nhiệt độ phòng và nhiệt độ nước được giữ ở 26-28°C. Sau 24 giờ, việc bơm khí được dừng lại, và thiết bị chiếu sáng được di chuyển xuống đáy của bình chứa, ấu trùng *Artemia salina* L. được thu hút xuống đáy của bình chứa bởi tính hướng sáng, và để yên trong 5 phút. Ở thời điểm này, trứng chưa được ủ và vỏ trứng rỗng sau khi ủ nổi lên bề mặt nước, và vỏ trứng nổi lên được loại bỏ bằng nguyên tắc dùng ống xi-phông hoặc các dụng cụ khác có khả năng hấp thu nước. Ấu trùng tuổi đầu tiên đã ủ được lọc nhẹ bằng màn (kích thước lỗ là 120µm), và được rửa nhẹ bằng nước biển, và sau đó bổ sung vào 2l dung dịch ủ được làm mới. Dung dịch ấp được khuấy nhẹ, để phân bố đồng đều ấu trùng *Artemia salina* L. 1ml dung dịch ủ được hút ra, và được nhỏ giọt vào 1ml đĩa đếm kê ô. Để tránh xáo trộn ấu

trùng, ấu trùng có thể bị giết bằng cách đặt trên đĩa nóng 50°C trong 10 phút, nhờ đó tạo thuận lợi cho việc đếm. Khi đếm, đĩa đếm được đặt dưới kính hiển vi phân tích ở độ phóng đại 60-100 để quan sát. Đĩa đếm được cắt bằng 1000 ô, và cách đếm có thể là 10 x 10 ô (số lượng ấu trùng mỗi 0,1ml) được lựa chọn ngẫu nhiên để đếm số lượng ấu trùng, và số lượng ở các vị trí khác của đĩa có thể được đếm, tính trung bình và nhân với 10, để thu được số lượng ấu trùng mỗi ml, hoặc tổng số ấu trùng trên đĩa này có thể được đếm. Theo kết quả đếm, mật độ *Artemia salina* L. được điều chỉnh đến 500 ấu trùng mỗi ml. Đá bọt được đặt vào và bắt đầu bơm khí, và thể tích hấp thu khí được điều chỉnh đến khoảng 300-400cm³/phút (để duy trì oxy hòa tan cao hơn 2ppm). Nhiệt độ phòng và nhiệt độ nước được giữ ở 26-28°C. Sau 12-18 giờ ủ, *Artemia salina* L. trải qua sự lột xác lần thứ nhất và trở thành ấu trùng tuổi thứ hai. Ở thời điểm này, bước đóng nang sinh học được thực hiện.

Đóng nang sinh học: *E. coli* được ly tâm và lắng xuống ở 1000xg. Môi trường dư được gạn, và vi khuẩn được tái huyền phù lại bằng một lượng tương đương PBS, để rửa sạch môi trường dư trên vi khuẩn. Việc ly tâm ở 1000 x g được thực hiện lại, và vi khuẩn được tái huyền phù lại bằng một lượng PBS thích hợp, để tạo ra dung dịch vi khuẩn có nồng độ 1×10^{10} cfu/ml. Phương pháp tiệt trùng là tiệt trùng gia nhiệt, trong đó dung dịch vi khuẩn được đặt trong bể nước 65°C trong 10 phút, và sau đó dung dịch đã tiệt trùng được đặt trên đá trong 10 phút. Ấu trùng tuổi thứ hai của *Artemia salina* L. được đóng gói thành các thể tích mong muốn, và được bổ sung cùng với dung dịch vi khuẩn đã tạo ra đến nồng độ cuối cùng của *E. coli* là khoảng 1×10^{10} cfu /ml, và khí được bơm thích hợp trong 2 giờ.

Xác định các kết quả đóng nang: việc bơm khí được dừng lại trước khi lấy mẫu, 2ml dung dịch *Artemia salina* L. đã đóng nang được hút lên màn nhỏ và được rửa bằng các lượng lớn nước sạch. Các ấu trùng *Artemia salina* L. được hút vào ống ly tâm. Ống vi ly tâm được đặt vào tủ lạnh ở -20°C trong 10 phút để làm lạnh ấu trùng *Artemia salina* L. đến chết, và sau đó ấu trùng *Artemia salina* L. đã chết được rót vào đĩa nuôi cấy có đường kính 9cm, lượng nhỏ nước đã tiệt trùng được bổ sung vào để phân phối đồng nhất ấu trùng *Artemia salina* L., và

sau đó 500 ấu trùng tuổi thứ hai được hút bằng Pipet vào ống vi ly tâm, được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút để tập trung ấu trùng ở đáy của ống ly tâm, nước trong ống ly tâm được loại bỏ và thay thế bằng 100µl nước tiệt trùng. Các ấu trùng *Artemia salina* L. được nghiền thật trọng trong ống vi ly tâm bằng thanh vi nghiền. Các mẫu được đưa vào SDS-PAGE và thẩm tách Tây.

Sản xuất thức ăn chứa *Artemia salina* L.

Nước chứa *Artemia salina* L. đã lọc hoặc chưa lọc tuổi thứ hai được loại bỏ càng nhiều càng tốt, và làm đông khô thành bột bằng cách sử dụng máy làm đông khô. Bột *Artemia salina* L. được trộn với thức ăn nghiền nhỏ thông thường ở tỉ lệ 1:1000, và sau đó tạo hạt lại.

Sản xuất chế phẩm thức ăn:

Chất lỏng vi khuẩn được cô đặc, và làm đông khô thành bột bằng cách sử dụng máy làm đông khô. Bột vi khuẩn được trộn với thức ăn đã nghiền nhỏ thông thường ở tỉ lệ 1g thức ăn với $3,3 \times 10^9$ cfu bột vi khuẩn E-coli, và sau đó tạo hạt lại.

Thử nghiệm động vật

Nhóm *Artemia salina* L.: các động vật thử nghiệm được chia thành 4 nhóm: nhóm thử nghiệm PEIa-epitop, và 3 nhóm đối chứng được cho ăn lần lượt bằng thức ăn thông thường, thức ăn chứa *Artemia salina* L. và thức ăn chứa *Artemia salina* L. được đóng nang với đoạn PEIa. Tổng số 80 *Epinephelus coioides* có khối lượng trung bình là khoảng 52,36g và chiều dài trung bình là từ 5 đến 6 inso được sử dụng, thời gian thử nghiệm là khoảng 12 tuần. Các động vật được nuôi bằng thức ăn chứa kháng nguyên mỗi thứ 2, thứ 3, thứ 4, bằng thức ăn thông thường mỗi thứ 5, thứ 6 và thứ 7 và bỏ đói vào chủ nhật, máu cá được lấy ra trước và ở thời điểm 2 tuần sau khi gây miễn dịch, máu này được làm đặc sau khi để yên trong 20 đến 40 phút, ly tâm và sau đó được lấy mẫu dịch nổi máu để tiến hành thử nghiệm ELISA, để xác định hiệu giá kháng thể kháng protein nội sinh trong máu.

Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA)

Bằng cách sử dụng nguyên tắc liên kết đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể, 1 μ g (100 μ l) đoạn protein tái tổ hợp SPARC-His được trộn đồng nhất lần thứ nhất với đệm phủ, hỗn hợp này được bổ sung vào đáy của đĩa Nunc-Immuno™ 96 lỗ (NUNC™), và để yên qua đêm ở 4°C, để cho phép protein gắn vào đáy. Đĩa này được rửa 3 lần bằng PBST, được bổ sung 100 μ l dung dịch TBST chứa 5% sữa tách kem và được phản ứng trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, và được rửa lại ít nhất 3 lần bằng PBST. Huyết thanh thử nghiệm được pha loãng bằng PBST được sử dụng làm kháng thể sơ cấp, được bổ sung vào các lỗ, và để yên ở nhiệt độ phòng trong khoảng 2-3 giờ. Đĩa này được rửa ít nhất 3 lần bằng PBST, và sau đó bổ sung 100 μ l huyết thanh chuột kháng *Epinephelus* spp. làm kháng thể thứ cấp, để yên trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, và được rửa ít nhất 3 lần bằng PBST. Cuối cùng, 100 μ l huyết thanh dê kháng chuột được gắn với phosphatase kiềm ở phần cuối được bổ sung dưới dạng kháng thể tam cấp, và để yên trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, và sau đó đĩa này được rửa bằng PBST. Cuối cùng, 50 μ l dung dịch viên nén cơ chất p-nitrophenyl phosphat được bổ sung vào mỗi lỗ, để yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút (tùy vào mức hiện màu), và sau đó đo độ hấp thụ ở OD₄₀₅ bằng máy phân tích tế bào bằng enzym.

Kết quả

Nhóm *Artemia salina* L.

Máu của *Epinephelus* spp. được lấy ra trước, huyết thanh được tách ra để phát hiện hiệu giá kháng thể trong huyết thanh *Epinephelus* spp. với epitop protein tiết có tính axit và giàu xystein của protein tiết có tính axit và giàu xystein của *Epinephelus* spp. tái tổ hợp sau khi cho ăn protein dung hợp tái tổ hợp chứa epitop protein tiết có tính axit và giàu xystein ở mỗi giai đoạn bằng ELISA. Hiệu giá kháng thể được phát hiện ở thời điểm 10 tuần sau khi gây miễn dịch, và tiếp tục tăng lên đến 12 tuần, trong đó hiệu giá kháng thể của nhóm PEIa-epitop là cao hơn hiệu giá kháng thể của 3 nhóm đối chứng được nuôi bằng thức ăn thông thường, thức ăn chứa *Artemia salina* L. và thức ăn chứa *Artemia salina* L. được đóng nang với đoạn PEIa, và hiệu giá kháng thể

đạt tới khoảng 395 (như được thể hiện trong FIG.1).

Tổng lượng thức ăn tiêu thụ và tỉ lệ chuyển hóa thức ăn trong 12 tuần thử nghiệm trên động vật được tính toán. Được phát hiện từ số liệu thống kê là tổng lượng thức ăn tiêu thụ của nhóm thử nghiệm PEIa-epitop và 3 nhóm đối chứng còn lại trong 12 tuần là xấp xỉ bằng nhau, tỉ lệ chuyển hóa thức ăn trung bình là 1,46 với nhóm thử nghiệm PEIa-epitop, và là 2,67, 2,58, và 2,81 đối với 3 nhóm đối chứng được nuôi bằng thức ăn thông thường, thức ăn chứa *Artemia salina* L. và thức ăn chứa *Artemia salina* L. được đóng nang với đoạn PEIa, nghĩa là càng ít thức ăn được tiêu thụ trong nhóm thử nghiệm được nuôi bằng epitop protein tiết có tính axit và giàu xystein trước khi bán, thu được *Epinephelus* spp càng nhiều thịt (như đã chỉ ra trong bảng 1).

Bảng 1:

	Đối chứng	Chỉ có Artemia	Artemia với PEIa	Artemia với PEIa-epitop
FCR	2,67	2,58	2,81	1,46

Ví dụ 2: Tác dụng ức chế miễn dịch của myostatin:

Tạo ra *E.coli* biểu hiện protein tái tổ hợp epitop myostatin

Quy trình nuôi cấy lên men 35L được thiết lập, để nuôi cấy chủng *E. coli* BL21(DE3) chứa epitop trong bình lên men 50L. 4 ống chứa 5ml chủng vi khuẩn được nuôi cấy qua đêm với môi trường LB/ampixilin ở 37°C lần lượt được cấy vào môi trường 0,2L LB/ampixilin và toàn bộ 1L được lắc và nuôi cấy ở 37°C đến OD₆₀₀ là 0,3, và sau đó bổ sung vào 35L môi trường để nuôi cấy và lấy mẫu để xác định OD₆₀₀ mỗi 2 giờ để theo dõi các thay đổi về đường cong phát triển. Các thời điểm thích hợp được lựa chọn tiếp theo đường cong phát triển, IPTG có nồng độ cuối cùng là 0,1mM được bổ sung vào để kích thích *E. coli* biểu hiện protein dung hợp ở mức độ cao, lắc và nuôi cấy ở 37°C trong 3 giờ, và ly tâm để thu hồi vi khuẩn. Sự biểu hiện của protein dung hợp này được xác định bằng SDS-PAGE và thẩm tách Tây để xác định các điều kiện lên men 35L tối ưu.

Bào chế vacxin dùng qua đường miệng chứa *Artemia salina* L. được đóng nang sinh học

Ủ *Artemia salina* L.: 4g trứng khô của *Artemia salina* L. được cân, đặt vào cốc có mỏ 250ml, và ngâm trong 150ml nước sạch đã bổ sung trong 0,5 giờ. Trứng nghỉ của *Artemia salina* L. được lọc bằng màn và rửa bằng lượng nước sạch thích hợp. Trứng nghỉ của *Artemia salina* L. được bổ sung vào 5l dung dịch ủ, và được phân bố đồng nhất. Đá bọt được đặt vào và bắt đầu bơm khí, và thể tích hấp thu khí được điều chỉnh đến khoảng 500cm³/phút (để duy trì oxy hòa tan cao hơn 2ppm). Thiết bị chiếu sáng được bật lên, nhiệt độ phòng và nhiệt độ nước được giữ ở 26-28°C. Sau 24 giờ, việc bơm khí được dừng lại, và thiết bị chiếu sáng được di chuyển xuống đáy của bình chứa, ấu trùng *Artemia salina* L. bị thu hút xuống đáy của bình chứa do tính hướng sáng, và để yên trong 5 phút. Ở thời điểm này, trứng chưa ủ và vỏ trứng rỗng sau khi ủ nổi lên mặt nước, và vỏ trứng nổi được loại bỏ bằng nguyên tắc dùng ống xi-phông hoặc các dụng cụ khác có khả năng hấp thụ nước. Ấu trùng tuổi thứ nhất đã ủ được lọc nhẹ bằng màn (kích thước lỗ là 120µm), và được rửa nhẹ nhàng bằng nước biển và sau đó được bổ sung vào 2l dung dịch ủ được làm mới. Dung dịch ấp được khuấy nhẹ, để phân bố đồng nhất ấu trùng *Artemia salina* L.. 1ml dung dịch ủ được hút ra, và nhỏ giọt vào đĩa đếm chia ô 1ml. Để tránh xáo trộn ấu trùng, các ấu trùng có thể bị giết bằng cách đặt lên đĩa nóng 50°C trong 10 phút, nhờ đó tạo thuận lợi cho việc đếm. Khi đếm, đĩa đếm được đặt dưới kính hiển vi phân tích ở độ phóng đại 60-100 để quan sát. Đĩa đếm được cắt 1000 ô, và cách đếm có thể là 10 x 10 ô (số lượng ấu trùng mỗi 0,1ml) được chọn ngẫu nhiên để đếm số lượng ấu trùng, và số lượng trên các vị trí khác của đĩa có thể được đếm, tính trung bình, nhân với 10 để thu được số lượng ấu trùng mỗi ml, hoặc tổng số ấu trùng trên đĩa có thể được đếm. Theo kết quả đếm được, mật độ *Artemia salina* L. được điều chỉnh đến 500 ấu trùng mỗi ml. Đá bọt được đặt vào và bắt đầu bơm khí, và thể tích hấp thu khí được điều chỉnh đến khoảng 300-400cm³/phút (để duy trì lượng oxy hòa tan cao hơn 2ppm). Nhiệt độ phòng và nhiệt độ nước được giữ ở 26-28°C. Sau 12-18 giờ ủ, *Artemia salina* L. lột xác lần thứ nhất và trở thành ấu trùng tuổi thứ hai. Ở thời điểm này, bước đóng nang

sinh học được thực hiện.

Đóng nang sinh học: *E. coli* được ly tâm và để lắng xuống ở 1000xg. Môi trường dư được gạn, và vi khuẩn được tạo huyền phù lại bằng lượng tương đương PBS, để rửa sạch môi trường dư trên vi khuẩn. Việc ly tâm ở 1000 x g được thực hiện lại, và vi khuẩn được tạo huyền phù lại bằng lượng thích hợp PBS, để tạo ra dung dịch vi khuẩn có nồng độ là 1×10^{10} cfu/ml. Phương pháp tiệt trùng là tiệt trùng nóng, trong đó dung dịch vi khuẩn được đặt trong thùng nước 65°C trong 10 phút, và sau đó dung dịch tiệt trùng được đặt trên đá trong 10 phút. Ấu trùng tuổi thứ hai của *Artemia salina* L. được đóng gói thành các thể tích mong muốn, và bổ sung thêm dung dịch vi khuẩn đã bào chế đến nồng độ cuối cùng của *E. coli* là khoảng 1×10^{10} cfu/ml, và không khí được bơm thích hợp trong 2 giờ.

Xác định các kết quả đóng nang: Việc bơm không khí được dừng lại trước khi lấy mẫu, 2ml dung dịch *Artemia salina* L. đã đóng nang được hút lên màng nhỏ và được rửa bằng lượng lớn nước mới. Ấu trùng *Artemia salina* L. được hút vào ống ly tâm. Ống vi ly tâm được đặt vào tủ lạnh ở -20°C trong 10 phút để làm lạnh ấu trùng *Artemia salina* L. đến chết, và sau đó ấu trùng *Artemia salina* L. đã chết được rót vào đĩa nuôi cấy có đường kính 9cm, lượng nhỏ nước đã tiệt trùng được bổ sung vào để phân bố đồng đều ấu trùng *Artemia salina* L., và sau đó 500 ấu trùng tuổi thứ hai được hút bằng pipet vào ống vi ly tâm, được ly tâm ở 3000 vòng/phút để tập trung ấu trùng ở đáy của ống ly tâm, nước trong ống ly tâm được loại bỏ và thay thế bằng 100µl nước tiệt trùng. Ấu trùng *Artemia salina* L. được nghiền thận trọng trong ống vi ly tâm bằng thanh nghiền nhỏ. Các mẫu được tiến hành SDS-PAGE và thẩm tách Tây.

Thử nghiệm trên động vật

Nhóm *Artemia salina* L.: Các động vật thử nghiệm được chia làm 4 nhóm: nhóm thử nghiệm nhóm PEIa-epitop, và 3 nhóm đối chứng được nuôi lần lượt bằng thức ăn thông thường, thức ăn chứa *Artemia salina* L. và thức ăn chứa *Artemia salina* L. được đóng nang với đoạn PEIa. Tổng số 40 *Epinephelus coioides* có khối lượng trung bình là khoảng 157g và chiều dài trung bình là 5

đến 6 inso được sử dụng, thời gian thử nghiệm là khoảng 4 tháng. Các động vật được nuôi bằng thức ăn chứa kháng nguyên mỗi thứ hai, thứ ba, thứ tư, bằng thức ăn thông thường mỗi thứ năm, thứ sáu, và thứ bảy, và bị bỏ đói vào chủ nhật, và máu cá được lấy ra trước và vào thời điểm 2 tuần sau khi gây miễn dịch, máu này được làm đặc lại sau khi để yên trong 20-40 phút, ly tâm và sau đó lấy mẫu dịch nổi máu để tiến hành thử nghiệm ELISA, để xác định hiệu giá kháng thể kháng protein nội sinh trong máu.

Sản xuất thức ăn chứa *Artemia salina* L.: Nước chứa *Artemia salina* L. tuổi thứ hai đã lọc hoặc chưa lọc được loại bỏ càng nhiều càng tốt, và được làm đông khô thành bột bằng cách sử dụng máy làm đông khô. Bột *Artemia salina* L. được trộn với thức ăn đã nghiền nhỏ thông thường với tỉ lệ 1:1000, và sau đó được tạo hạt lại.

Sản xuất chế phẩm thức ăn: Dịch lỏng vi khuẩn được cô đặc, và được làm đông khô thành bột bằng cách sử dụng máy làm đông khô. Bột vi khuẩn được trộn với thức ăn nghiền nhỏ thông thường với tỉ lệ là 1g thức ăn với $3,3 \times 10^9$ cfu bột vi khuẩn E-coli, và sau đó được tạo hạt lại.

Kết quả

Nhóm *Artemia salina* L.

Máu của *Epinephelus* spp. được rút ra lần thứ nhất, huyết thanh được tách ra để phát hiện hiệu giá kháng thể của huyết thanh *Epinephelus* spp. đối với epitop ở đầu tận cùng C của myostatin *Epinephelus* spp. tái tổ hợp sau khi cho ăn protein dung hợp tái tổ hợp chứa epitop tái tổ hợp chứa epitop myostatin ở mỗi giai đoạn bằng ELISA. Hiệu giá kháng thể được phát hiện ở thời điểm 10 tuần sau khi gây miễn dịch, và tiếp tục tăng lên đến tận 16 tuần, trong đó hiệu giá kháng thể của nhóm PEIa-epitop cao hơn hiệu giá kháng thể của 3 nhóm đối chứng được nuôi bằng thức ăn thông thường, thức ăn chứa *Artemia salina* L. và thức ăn chứa *Artemia salina* L. được đóng nang với đoạn PEIa, và hiệu giá kháng thể đạt tới khoảng 920 (như được thể hiện trong FIG.3).

Tổng lượng tiêu thụ thức ăn và tỉ lệ chuyển hóa thức ăn trong 4 tháng thử

nghiệm trên động vật được tính toán. Được phát hiện từ số liệu thống kê là tổng lượng tiêu thụ thức ăn của nhóm thử nghiệm PEIa-epitop và 3 nhóm đối chứng khác trong 4 tháng là xấp xỉ bằng nhau, tỉ lệ chuyển hóa thức ăn trung bình là 1,35 với nhóm thử nghiệm PEIa-epitop, và là 1,72, 1,76, và 1,82 đối với 3 nhóm đối chứng được nuôi bằng thức ăn thông thường, thức ăn chứa *Artemia salina* L. và thức ăn chứa *Artemia salina* L. được đóng nang với đoạn PEIa, nghĩa là lượng thức ăn được sử dụng trong nhóm thử nghiệm được nuôi bằng epitop myostatin trước khi bán càng ít, thì *Epinephelus* spp thu được càng có nhiều thịt (như được thể hiện trong bảng 2).

Bảng 2:

	Đối chứng	Chỉ có artemia	Artemia với PEIa	Artemia với PEIa-epitop
FCR	1,72	1,76	1,82	1,35

Mặc dù các phương án theo sáng chế được minh họa và mô tả, nhưng nhiều biến đổi và cải thiện khác nhau có thể được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Dự định là sáng chế không bị giới hạn ở các dạng cụ thể như được minh họa, và tất cả các biến đổi này không vượt quá phạm vi của sáng chế và nằm trong phạm vi như được xác định trong yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thức ăn cho động vật có xương sống, trong đó chế phẩm này chứa protein dung hợp mà đoạn SPARC (Protein tiết có tính axit và giàu xystein - Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) được mã hóa bởi axit nucleic được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn môi 1 (SEQ ID NO.3) và đoạn môi 2 (SEQ ID NO.4) dựa vào gen sparc và vùng Ia của ngoại độc tố A *Pseudomonas* được dung hợp, trong đó động vật có xương sống này là cá.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó protein dung hợp mà đoạn SPARC và vùng Ia của ngoại độc tố A *Pseudomonas* được dung hợp, là một protein phức được đóng nang sinh học trong tôm.
3. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó đoạn của protein tiết có tính axit và giàu xystein được lắp lại kế tiếp trong protein dung hợp.
4. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa protein dung hợp thu được bằng cách dung hợp đoạn epitop myostatin nêu trong SEQ ID NO: 1 với vùng Ia của ngoại độc tố A *Pseudomonas*.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó protein dung hợp mà đoạn epitop myostatin nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng Ia của ngoại độc tố A *Pseudomonas* được dung hợp, là một protein phức được đóng nang sinh học trong tôm.
6. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó protein dung hợp mà đoạn epitop của myostatin nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng Ia của ngoại độc tố A *Pseudomonas* được dung hợp, được lắp lại kế tiếp trong protein dung hợp.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TRƯỜNG ĐẠI HỌC QUỐC GIA CHENG KUNG

<120> CHẾ PHẨM THỨC ĂN CHO ĐỘNG VẬT CÓ XƯƠNG SỐNG

<130> Không

<160> 4

<170> Patent phiên bản 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Chuột

<400> 1

Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys
1				5					10					15

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Chuột

<220>

<221> X

<222> (1)..(4)

<223> X là gốc axit amin bất kỳ

<400> 2

Arg	Xaa	Arg	Arg
1			

<210> 3

<211> 34

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nhân tạo

<400> 3

g	c	g	c	c	g	a	a	t	t	c	c	g	t	c	t	a	c	t	g	a	g	g	a	g	a	g	c	c
34																												

<210> 4

<211> 35

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nhân tạo

<400> 4

gcgccgctcg aggatgatga ggtctttgtc cacgt

35

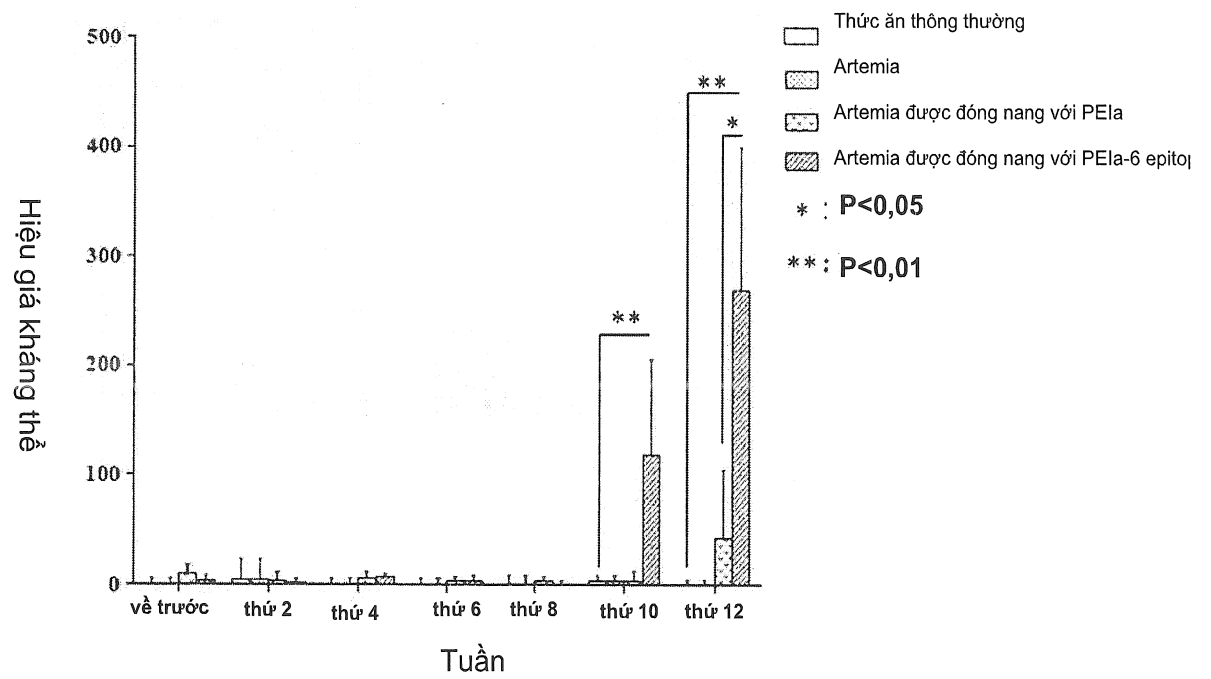


FIG. 1

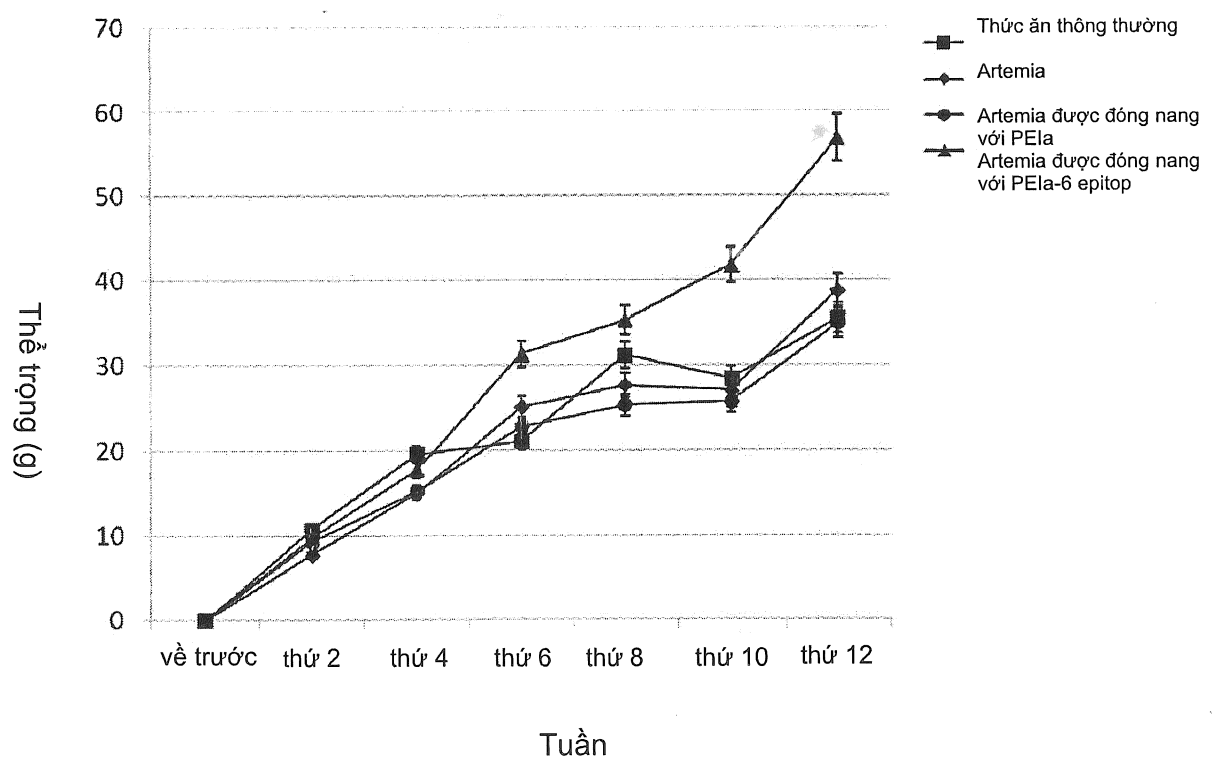


FIG. 2

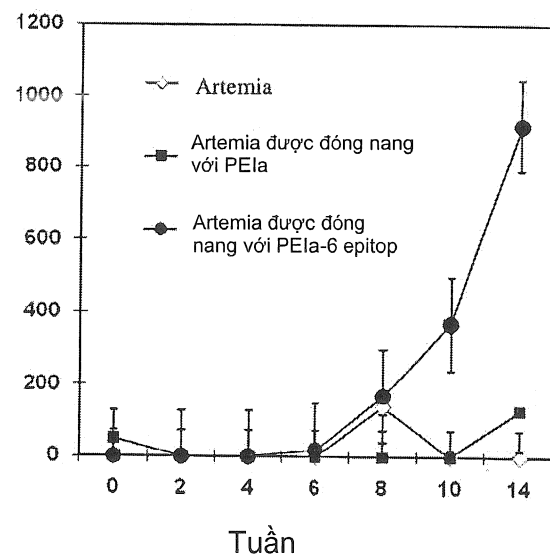


FIG. 3