



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105764333 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201480062691.6

(22) 申请日 2014.11.14

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105764333 A

(43) 申请公布日 2016.07.13

(30) 优先权数据  
61/904,652 2013.11.15 US  
61/968,458 2014.03.21 US  
62/050,815 2014.09.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.05.16

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/065698 2014.11.14

(87) PCT国际申请的公布数据  
WO2015/073819 EN 2015.05.21

(73) 专利权人 马里兰大学巴尔的摩县  
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 约纳坦·祖海尔 翁天佐

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51) Int.Cl.  
A01K 61/00 (2017.01)  
A01K 61/10 (2017.01)  
A01K 61/17 (2017.01)

(56) 对比文件  
EP 2535404 A1, 2012.12.19  
EP 2535404 A1, 2012.12.19  
US 7935816 B2, 2011.05.03  
WO 2005/001028 A2, 2005.01.06  
CN 1559201 A, 2005.01.05  
CN 101652475 A, 2010.02.17  
CN 1528131 A, 2004.09.15  
US 2005/132969 A1, 2005.06.23

审查员 孙婷

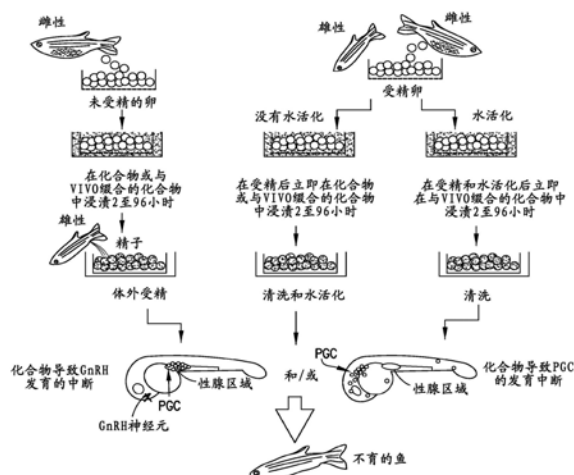
权利要求书3页 说明书12页  
序列表1页 附图12页

### (54) 发明名称

生产不育的鱼和产卵水生动物及递送化合物至卵和胚胎中的方法

### (57) 摘要

描述了用于生产用于水产养殖、水族贸易和控制入侵物种的生殖绝育的鱼和水生动物的方法。所述方法包括通过施用导致可育的性腺发育衰退的化合物中断性腺发育。可以通过在包含感兴趣的化合物的浸渍介质中与未受精的卵或水活化前的受精卵或受精卵接触将化合物递送至受精前的卵或水活化前的卵或受精和水活化后的卵中。化合物可以与对绒毛膜运输缀合物有效的分子转运体化合物缀合。该化合物可以是能够有效地抑制用于鱼和其它产卵水生动物的生殖细胞发育的dead end基因或其它必需的基因的表达的反义吗啉代低聚物。



1. 一种将反义吗啉代低聚物递送到未受精的或受精的鱼卵中的方法,所述反义吗啉代低聚物抑制由所述鱼卵产生的鱼的dead end基因的表达以使所述鱼生殖绝育,所述方法包括:将所述鱼卵浸渍在包含所述反义吗啉代低聚物的浸渍介质中,并且其中(a)如果所述鱼卵是受精的鱼卵,则所述反义吗啉代低聚物与分子转运体缀合,所述分子转运体包括包含三嗪核部分的八胍树枝状聚合物,以及(b)所述反义吗啉代低聚物包括选自SEQ ID NOS: 1-4的低聚物及其变体组成的组的低聚物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述鱼卵是未受精的鱼卵或水活化前的受精的鱼卵。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述浸渍介质包括所述反义吗啉代低聚物的含水介质。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述浸渍介质中的所述反义吗啉代低聚物的浓度为1-20 $\mu$ M。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述浸渍介质中的所述反义吗啉代低聚物的浓度为3-15 $\mu$ M。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述浸渍介质中的所述反义吗啉代低聚物的浓度为5-10 $\mu$ M。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述反义吗啉代低聚物与分子转运体缀合,所述分子转运体包括包含三嗪核部分的八胍树枝状聚合物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述分子转运体是2-[ (4-硝基苯基) 氧代羰基六亚甲基羰基哌嗪基]-4,6-双{二[二(三氟乙酰氨基己基)-氨基羰基氧代乙基]氨基} 三嗪。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述反义吗啉代低聚物包括选自SEQ ID NOS: 1-4的低聚物组成的组的低聚物。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:1的低聚物。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:2的低聚物。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:3的低聚物。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:4的低聚物。

14. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述浸渍进行2至96小时的时间。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述浸渍进行4至72小时的时间。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述浸渍进行5至48小时的时间。

17. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述未受精的鱼卵或水活化前的受精的鱼卵包括选自自由鲑科鱼、狼鲈科鱼和慈鲷科鱼组成的组的鱼的卵。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述未受精的鱼卵或水活化前的受精的鱼卵包括选自自由如下组成的组的鱼的卵:大西洋鲑鱼、银鲑鱼、奇努克鲑鱼、狗鲑鱼、红鲑鱼、粉鲑鱼、樱花钩吻鲑鱼、虹鳟鱼、小溪鳟鱼、褐鳟鱼、北极茴鱼、北极红点鲑、狼鲈、河鲈、狼鲈-河鲈杂交种、尼罗罗非鱼、奥里亚罗非鱼、奥里亚罗非鱼-尼罗罗非鱼杂交种、莫桑比克罗非

鱼、斑马鱼、鲤鱼、欧鳊、鲃鱼和鳊鱼。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中, 所述狼鲈是杂交狼鲈、条纹狼鲈、金眼狼鲈或黄狼鲈。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中, 所述河鲈是美洲白鲈、黄鲈或欧洲河鲈。

21. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述鱼卵是受精的鱼卵。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述浸渍介质包括与所述分子转运体缀合的所述反义吗啉代低聚物的含水介质。

23. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述浸渍介质中的所述反义吗啉代低聚物的浓度为20-80 $\mu$ M。

24. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述分子转运体是2-[ (4- 硝基苯基) 氧代羰基六亚甲基羰基哌嗪基]-4,6-双{二[二(三氟乙酰氨基己基)-氨基羰基氧代乙基]氨基}三嗪。

25. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括选自由SEQ ID NOS:1-4的低聚物组成的组的低聚物。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:1的低聚物。

27. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:2的低聚物。

28. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:3的低聚物。

29. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:4的低聚物。

30. 根据权利要求21所述的方法, 其中, 所述受精的鱼卵包括选自由鲑科鱼、狼鲈科鱼和慈鲷科鱼组成的组的鱼的卵。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其中, 所述受精的鱼卵包括选自由如下组成的组的鱼的卵: 大西洋鲑鱼、银鲑鱼、奇努克鲑鱼、狗鲑鱼、红鲑鱼、粉鲑鱼、樱花钩吻鲑鱼、虹鳟鱼、小溪鳟鱼、褐鳟鱼、北极茴鱼、北极红点鲑、狼鲈、河鲈、狼鲈-河鲈杂交种、尼罗罗非鱼、奥里亚罗非鱼、奥里亚罗非鱼-尼罗罗非鱼杂交种、莫桑比克罗非鱼、斑马鱼、鲤鱼、欧鳊、鲃鱼和鳊鱼。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中, 所述狼鲈是杂交狼鲈、条纹狼鲈、金眼狼鲈或黄狼鲈。

33. 根据权利要求31所述的方法, 其中, 所述河鲈是美洲白鲈、黄鲈或欧洲河鲈。

34. 一种用于处理鱼卵以使由该鱼卵产生的鱼生殖绝育的组合物, 所述组合物包含与八胍树枝状聚合物分子转运体缀合的反义吗啉代低聚物, 其中所述反义吗啉代低聚物抑制所述鱼的dead end基因的翻译, 所述反义吗啉代低聚物选自由SEQ ID NOS:1-4的低聚物及其变体组成的组。

35. 根据权利要求34所述的组合物, 其中, 所述分子转运体是2-[ (4- 硝基苯基) 氧代羰基六亚甲基羰基哌嗪基]-4,6-双{二[二(三氟乙酰氨基己基)-氨基羰基氧代乙基]氨基}三嗪。

36. 根据权利要求34所述的组合物, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括选自由SEQ ID NOS:1-4的低聚物组成的组的低聚物。

37. 根据权利要求36所述的组合物, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:1的低聚物。

38. 根据权利要求36所述的组合物, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:2的低聚物。

39. 根据权利要求36所述的组合物, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:3的低聚物。

40. 根据权利要求36所述的组合物, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:4的低聚物。

41. 转染鱼卵, 包括与八爪树枝状聚合物分子转运体缀合的反义吗啉代低聚物, 其中所述反义吗啉代低聚物抑制所述鱼的dead end基因的翻译, 所述反义吗啉代低聚物选自由SEQ ID NOS:1-4的低聚物及其变体组成的组。

42. 根据权利要求41所述的转染鱼卵, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括选自由SEQ ID NOS:1-4的低聚物组成的组的低聚物。

43. 根据权利要求42所述的转染鱼卵, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:1的低聚物。

44. 根据权利要求42所述的转染鱼卵, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:2的低聚物。

45. 根据权利要求42所述的转染鱼卵, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:3的低聚物。

46. 根据权利要求42所述的转染鱼卵, 其中, 所述反义吗啉代低聚物包括SEQ ID NO:4的低聚物。

## 生产不育的鱼和产卵水生动物及递送化合物至卵和胚胎中的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年11月15日提交的美国临时申请号61/904,652、2014年3月21日提交的美国临时申请号61/968,458和2014年9月16日提交的美国临时申请62/050,815的优先权的权益。这些相关临时申请的公开内容特此通过引用以其整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及用于生产用于水产养殖、水族贸易和控制入侵物种的生殖绝育的鱼和其它产卵水生动物的方法。该方法包括通过施用导致可育的性腺发育衰退的化合物中断性腺发育。可以通过使未受精的卵或受精卵与感兴趣的化合物接触将这样的化合物递送至受精(或水活化)前或受精(或水活化)后的卵中。

### 背景技术

[0004] 水产养殖对解决当前和预期的全球可用水产品和海产品的短缺正变得越来越重要。由于依赖性继续从渔业收成向人工繁殖的水生物种转变,因此对水产养殖方法进行优化以使食品生产最大化并使生态影响减至最小越来越有必要,从而实现我们的海产品供应的长期环境可持续性。

[0005] 使养殖的鱼和其它产卵水生动物绝育(诱导的不育)通过提高食品能量向肌肉生长而不是向性腺发育的转化提高了它们的生长速率。另外,如果从水产养殖作业逃到环境中,生殖不育的养殖的鱼和其它产卵水生动物(包括驯养的、非本土的或基因修饰的物种)将不能繁殖或不能与野生群体进行品种间杂交。这将有助于生物防范,并防止野生群体的基因污染和/或在野外对驯养的、非本土的或基因修饰的养殖的鱼和水生产卵动物的建立。

[0006] 另外,鱼和其它产卵水生动物的生殖绝育阻止对专利保护的或其它受保护的基因选择或修饰的鱼和其它产卵水生动物进行未经授权的繁殖和销售。

### 发明内容

[0007] 本公开涉及生产绝育的产卵水生动物群体的方法,其中使不育的方法包括中断每个被处理的个体的原始生殖细胞的迁移和/或发育,而没有不利地影响正常动物的其它特征。

[0008] 本公开的一个方面涉及用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括:使未受精的卵或水活化前的受精卵与有效转染所述卵并使由该卵产生的个体生殖绝育的反义吗啉代低聚物接触。

[0009] 本公开的另一个方面涉及用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括:使未受精的卵或水活化前的受精卵与有效转染所述卵并使由该卵产生的个体生殖绝育的反义吗啉代低聚物接触,其中所述反义吗啉代低聚物与对绒毛膜运输缀合物有效的分子转运体化合物缀合。所述分子转运体化合物例如可以包括包含三嗪核部分的八肽树枝状聚

合物。

[0010] 在另一个方面,本公开涉及一种用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括:使受精卵与反义吗啉代低聚物接触,其中所述反义吗啉代低聚物与有效转染所述受精卵并使由该受精卵产生的个体生殖绝育的分子转运体化合物缀合。

[0011] 在本公开的再一个方面,提供一种用于将化合物递送至产卵水生动物的卵中的方法,包括:使未受精的卵或水活化前的卵与生物学有益的化合物或生物学有益的化合物与包括包含三嗪核部分的八胍树枝状聚合物的分子转运体化合物的缀合物接触。

[0012] 本公开的另一个方面涉及一种用于处理鱼卵以使由该鱼卵产生的鱼生殖绝育的组合物,所述组合物包含反义吗啉代低聚物,所述反义吗啉代低聚物包括选自在与鱼卵接触时有效使鱼生殖绝育的SEQ ID NOS:1-4的低聚物及其变体组成的组的低聚物。

[0013] 在再一个方面,本公开涉及一种组合物,其中所述反义吗啉代低聚物与对绒毛膜运输缀合物有效的分子转运体化合物缀合,其中所述分子转运体化合物包括包含三嗪核部分的八胍树枝状聚合物。

[0014] 根据随后的公开内容和所附的权利要求书,本发明的其它方面、特征和优点将变得更加完全地显而易见。

## 附图说明

[0015] 图1是根据本公开的实施方式的浸渍方法的流程图。

[0016] 图2是根据本公开的其它实施方式获得的生殖绝育的鱼的生产流程图。

[0017] 图3A、图3B、图3C和图3D是表示斑马鱼胚胎在与dnd-M0缀合的分子转运体Vivo的浸渍浴中的浸渍结果的显微照片。在图3A中,在用20 $\mu$ M zfdnd-M0-Vivo浸渍3小时后的鱼胚胎中发现了未经表征的聚集体。在图3B中,在浸渍5小时后出现了更多聚集体。在图3C和图3D中,在用20 $\mu$ M zfdnd-M0浸渍(3C)3小时和(3D)5小时(没有Vivo)的胚胎中没有发现聚集体。

[0018] 图4A和图4B是表示向鱼胚胎施用与有效阻断Dead end (Dnd) 蛋白质的翻译的反义吗啉代低聚物(M0)缀合的分子转运体的效果的荧光显微照片。图4A显示对照鱼中生殖细胞迁移到性腺区域并保持它们的形态。图4B显示zfdnd-M0-Vivo处理造成生殖细胞误迁移并最终分化成其它细胞类型。

[0019] 图5A和图5B是表示斑马鱼的经dnd-M0-Vivo处理的胚胎发育为雄性不育样成年鱼的照片和图示。图5A表明观察到经处理的成年鱼与野生型雄鱼之间在外观或整体大小上无差异。图5B表明经zfdnd-M0-Vivo处理的鱼和未经处理的野生型雄鱼中3个月大的鱼(通过随机抽样n=12)的体重无显著差异。

[0020] 图6是表示zfdnd-M0-Vivo诱导的斑马鱼绝育的显微照片。对性腺组织进行的检查表明,(图6的A)未经处理的雄鱼的精巢发育良好;(图6的B)未经处理的雌鱼的卵巢发育良好;(图6的C)经zfdnd-M0-Vivo处理的鱼的性腺发育为细丝样组织。显微照片(图6的D、E和F)表明,(图6的D)未经处理的雄鱼的精巢的精子形成活跃;(图6的E)具有处于不同发育阶段的卵母细胞的未经处理的雌鱼的卵巢发育良好;(图6的F)经处理的鱼的性腺似乎处在发育中并被大量脂肪细胞包围,而没有发达的性腺结构或生殖细胞。

[0021] 图7A和图7B是斑马鱼的经dnd-M0-Vivo处理的发育为不育成年鱼的胚胎的图示。

在图7A(浸渍24小时)和图7B(浸渍5-6小时)二者中,所有最初用60或40 $\mu$ M的zfdnd-MO-Vivo浸渍的胚胎都发育为不育鱼。

[0022] 图8是斑马鱼的经dnd-MO-Vivo处理的胚胎发育为不育成年鱼的图示。在几种优化条件下,在受精后立即开始浸渍并持续到24小时(或原基-5阶段(prim-5stage))和5-6小时(或50%外包阶段)的情况下,所有首先用60或40 $\mu$ M的zfdnd-MO-Vivo浸渍的胚胎都发育为不育的鱼。

[0023] 图9是表示卵在水活化前更具渗透性的显微照片。在如图9的A中所示的用40 $\mu$ M的zfdnd-MO-Flu(荧光素)浸渍5小时的情况下,未受精的卵比图9的B中所示的水活化前的卵摄取的zfdnd-MO-荧光素多(更强的绿色荧光)。

[0024] 图10举例说明了用于RNA提取的鱼的部分以及得到的结果。鲑科鱼(鲑鱼)卵在受精前用如下鲑科鱼的dnd-MO浸渍48小时:A:对照;B:10 $\mu$ M Ssdnd-MO;C:10 $\mu$ M Ssdnd-MO+1 $\mu$ M Ssdnd-MO-Vivo;D:10 $\mu$ M Ssdnd-MO+2 $\mu$ M Ssdnd-MO-Vivo。在用10 $\mu$ M Ssdnd-MO+1 $\mu$ M Ssdnd-MO-Vivo或10 $\mu$ M Ssdnd-MO+2 $\mu$ M Ssdnd-MO-Vivo处理卵时,生殖细胞被除去,其通过缺乏生殖细胞特异性标记基因vasa的表达来指示。

### 具体实施方式

[0025] 本公开在一个方面涉及通过使鱼或其它产卵水生动物的卵在受精前或水活化之前与有益的化合物接触将该化合物递送至所述卵中。传统上已经通过饲喂或注射感兴趣的化合物或在感兴趣的化合物中浸渍胚胎或个体实现了有益化合物向鱼或其它产卵水生动物的递送。然而,在大规模商业水产养殖操作中注射储备液(stock)不太实际。另外,利用浸渍处理受精和水活化的卵有限,因为卵的卵壳的渗透性低、无细胞的多层膜(也称为卵膜,主要由蛋白质和糖蛋白组成)厚。通常,在对鱼或其它产卵水生动物的胚胎进行的浸渍处理中,大分子化合物不能够穿过卵壳到达胚胎。

[0026] 在排卵/产卵之后并且在受精和水活化之前,卵具有可渗透的穿孔卵壳(或最外层膜),该可渗透的穿孔卵壳允许水和其它物质穿过孔或卵孔(卵壳上允许精子进入卵中进行受精的小孔)进入未受精的卵中。在受精和水活化后,卵壳变成密封状而使卵不可渗透,阻止进一步从环境摄取物质或水。

[0027] 已经发现,在排卵/产卵和受精/水活化之间的时间窗口期,卵是可渗透的,因而将浸渍介质中的化合物摄取到卵中是有效的。在进行短时间的浸渍之后,卵受精并被水活化,此时它们变得不可渗透并开始胚胎发育。

[0028] 本公开在某些方面描述了用于通过如下方式将化合物有效递送至产卵水生动物的卵中的方法:在卵对于环境物质是可渗透的时间窗口期(即,在排卵/产卵之后并且在受精之前,或在受精之后并且在水活化之前),使卵与感兴趣的化合物接触。在各种实施方式中,所述接触包括在包含一种或多种感兴趣的化合物的浸渍介质中浸渍所述卵。

[0029] 因此,在各个方面,本公开涉及使未受精的卵或水活化之前的受精卵与浸渍介质中的化合物接触。浸渍介质中使用的化合物可以促进产卵水生动物的绝育,并且在特定的实施方式中浸渍介质可以包括对由与该浸渍介质接触的卵孵化的产卵水生动物有利的另外的化合物或其它物质,例如,诸如DNA/RNA、激素、生长促进剂、保护性抗原、营养物等物质。

[0030] 因此,本公开考虑到生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,该方法涉及使卵在浸渍介质中与所选的导致个体生殖绝育的化合物接触。该绝育方法包括中断胚胎中的性腺发育。本公开还涉及防止驯养的、非本土的和基因修饰的养殖的鱼/其它产卵水生动物与它们的野生种之间进行品种间杂交的方法,以及涉及在野生地区建立这样的水产养殖的鱼和其它产卵水生动物的方法。另外,所公开的方法可以用于使得能够阻止养殖的鱼和其它产卵水生动物对野生群体造成基因污染。

[0031] 本公开的方法适用于产卵水生动物。本文使用的产卵水生动物包括抱卵(egg-bearing)水性动物物种,包括所有鱼种和其它产卵水生动物,如甲壳动物和/或软体动物。

[0032] 因此,产卵水生动物包括所有鱼种,包括但不限于鲑鱼(salmon)、大西洋鲑鱼(Atlantic salmon)、银鲑鱼(coho salmon)、奇努克鲑鱼(chinook salmon)、狗鲑鱼(chum salmon)、红鲑鱼(sockeye salmon)、粉鲑鱼(pink salmon)、樱花钩吻鲑鱼(masu salmon)、鳟鱼(trout)、虹鳟鱼(rainbow trout)、小溪鳟鱼(brook trout)、褐鳟(brown trout)、常见茴鱼(common grayling)、北极茴鱼(Arctic grayling)、北极红点鲑(Arctic char)、鲈鱼(bass)、杂交狼鲈(hybrid bass)、条纹狼鲈(striped bass)、金眼狼鲈(white bass)、条纹狼鲈-金眼狼鲈杂交种(striped-white bass hybrids)、黄狼鲈(yellow bass)、河鲈(perch)、美洲白鲈(white perch)、黄鲈(yellow perch)、欧洲河鲈(European perch)、鲈鱼-河鲈杂交种(bass-perch hybrids)、尼罗罗非鱼(Nile tilapia)、奥里亚罗非鱼(blue tilapia)、奥里亚罗非鱼-尼罗罗非鱼杂交种(blue-Nile tilapia hybrids)、莫桑比克罗非鱼(Mozambique tilapia)、斑马鱼(zebrafish)、鲤鱼(carp species)、欧鳊(breams)、海鲤(seabreams)、鲷鱼(porgies)、鲇鱼(catfish species)和鳕鱼(cod)。

[0033] 本公开的方法另外适用于产卵水生动物,如甲壳动物(crustacean)和/或软体动物(mollusk)。这样的产卵水生动物可以包括,但不限于草虾、对虾、龙虾、小龙虾、蟹、牡蛎、鱿鱼、章鱼等。

[0034] 将本文所定义的使产卵水生动物“绝育”理解为是指使个体不能进行有性繁殖。生殖绝育的产卵水生动物被定义为不能达到性成熟的个体或到达性成熟的年龄时不能繁殖的个体。

[0035] 生产生殖绝育的鱼和其它产卵水生动物的方法包括:向它们的受精之前的卵或水活化之前的卵施用化合物,以中断促性腺激素释放激素(GnRH)细胞发育和/或胚胎的性腺中原始生殖细胞(PGC)发育、迁移和定居,这导致性腺发育衰退和/或完整且正常的性腺机能在细胞或组织水平衰退,并最终导致产生绝育的鱼和其它产卵水生动物。

[0036] 脊椎动物的性腺发育和生殖周期的保持需要GnRH。具体地,GnRH,也称为黄体生成素释放激素(LHRH),刺激对性腺发育必需的促性腺激素(特别是促卵泡激素(FSH)和黄体生成素(LH))的合成与分泌,因此,中断GnRH的合成与分泌是诱导不育的强有力的方法。

[0037] PGC是鱼胚胎中的细胞群,是成年鱼和其它产卵水生动物的配子的前体。PGC在胚胎发育的极早期阶段产生。在胚胎发育的后期阶段,PGC穿过胚胎从它们的原始位置迁移到性腺前体区域中。在它们迁移结束时,PGC进入发育中的性腺中,定居于组织并开始配子形成的过程,导致成年鱼和其它产卵水生动物的性腺成熟。

[0038] 本公开的方法使得产生生殖绝育的(不育的)产卵水生动物。绝育策略将具体中断个体的性腺发育,而没有不利地影响任何其它特征,导致产生完全正常但生殖绝育的产卵



水生动物。

[0039] 图1是本公开的实施方式的浸渍方法的图解。如所示出的,通过在浸渍介质中感兴趣的化合物中浸渍未受精的卵(或水活化前的卵)或受精卵,将化合物递送至所述卵中。通常,根据物种和浸渍温度,将卵在化合物中浸渍大约2小时至大约96小时或更长时间。化合物的施用将优选在卵的卵壳为可渗透的时发生。用感兴趣的化合物进行处理将导致GnRH发育或PGC发育被中断的早期胚胎。当用浸渍方法处理卵时,所得到的成年鱼和其它产卵水生动物将是生殖不育或绝育的,通常没有可育的性腺发育。

[0040] 因此,在各种实施方式中,本公开提供通过使卵在受精之前或水活化之前与化合物接触将化合物有效地施用于胚胎的方法。所选的化合物中断大量胚胎中的GnRH细胞和/或PGC的发育、迁移和/或存活,导致大规模产生生殖绝育的成年鱼和其它产卵水生动物。本公开的方法也适用于以较小规模产生生殖绝育的成年鱼和其它产卵水生动物的单个胚胎。

[0041] 用于本公开的方法中的化合物可以包括已知用于中断GnRH细胞和/或PGC的发育、迁移和/或存活并且能够穿透受精之前或水活化之前的卵的卵壳的化合物。在一个方面,这样的化合物可以是能够中断GnRH细胞发育和/或PGC发育并且能够穿过卵的卵壳的反义吗啉代低聚物。这样,在本公开的方法中有用的反义吗啉代低聚物为有效转染所述卵并且使由该卵产生的个体生殖绝育的反义吗啉代低聚物。

[0042] 反义吗啉代低聚物被用于通过阻断翻译或为产生mRNA的关键步骤的RNA剪接来暂时使基因表达沉默。可以认为特异性反义吗啉代低聚物暂时阻断或抑制对胚胎生殖细胞发育必需的基因的表达,造成性腺发育衰退并最终产生绝育的鱼或其它产卵水生动物,所述基因包括但不限于deadend、nanos、vasa、gnrh或fsh受体。

[0043] 因此,在本公开的一个方面,提供一种用于产生生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括使未受精的卵或水活化前的受精卵与对转染所述卵并使由该卵产生的个体生殖绝育有效的反义吗啉代低聚物接触。所述接触包括绒毛膜转染所述卵。

[0044] 在这个方面,本公开涉及通过如下方式产生生殖绝育的产卵水生动物的方法:将有效的吗啉代低聚物施用于卵,以中断原始生殖细胞(PGC)的发育和迁移到并定居于胚胎的性腺,这导致性腺发育衰退和/或完整且正常的性腺机能在细胞或组织水平衰退,并最终导致产生绝育的鱼。

[0045] Dead end (dnd) 是生殖质和生殖细胞颗粒的对某些鱼的生殖细胞发育必需的脊椎动物特异性组分。dnd基因在生殖质和原始生殖细胞中特异性地表达。由于dnd被认为对PGC的正常迁移和存活是必需的,因此缺乏这种蛋白的胚胎发育变成绝育的成年体。

[0046] 所公开的方法对于生产用于水产养殖、水族贸易和控制入侵物种的生殖绝育的鱼和其它产卵水生动物是有用的。在一个方面,所述方法包括通过将对性腺发育必需的dead end mRNA (dnd-MO) 或其它基因的反义吗啉代低聚物施用于受精前或水活化前的卵来中断性腺发育,所述基因包括但不限于nanos、vasa、gnrh或fsh受体。dnd-MO或其它反义吗啉代低聚物对抗对性腺发育必需的基因的作用导致可育的性腺发育衰退,从而导致成年鱼绝育。

[0047] 在实施方式中,dnd-MO能够暂时抑制对胚胎生殖细胞发育必需的dead end蛋白的表达。

[0048] 本公开还涉及在用于抑制鱼的dead end基因表达的方法中使用的特异性吗啉代

低聚物序列。

[0049] 图2是用于通过如下方式产生生殖绝育的鱼的流程图：施用对抗鲑科鱼(salmonids)、狼鲈科鱼(moronids)或慈鲷科鱼(cichlids)的dead end mRNA的特异性吗啉代低聚物，以中断原始生殖细胞(PGC)的发育，这导致性腺发育衰退，并最终导致产生绝育的鱼。在没有使用吗啉代低聚物处理卵时，这些卵可以变成可育的亲鱼(broodstock)。

[0050] 如图2中所示，可以使鲑科鱼(salmonids)、狼鲈科鱼(moronids)或慈鲷科鱼(cichlids)或其它鱼种的卵与对抗相关鱼种的dead end基因的吗啉代低聚物接触。图2举例说明了施用对抗鲑科鱼(salmonids)、狼鲈科鱼(moronids)或慈鲷科鱼(cichlids)的dead end基因的特异性吗啉代低聚物。或者，可以对卵不作任何处理。如所示的，在使未受精的卵与吗啉代低聚物接触的情况下，低聚物实现了对Dead end蛋白翻译的抑制或阻断，导致PCG发育中断。因此，成年的鲑科鱼(salmonids)、狼鲈科鱼(moronids)或慈鲷科鱼(cichlids)最终是不育的，因为没有可育的性腺发育。当允许PGC正常发育时，鱼将具有正常的可育的性腺发育，因而该鱼可以用作亲鱼。

[0051] 因此，在实施方式中，反义吗啉代低聚物能够有效地抑制鲑科的dead end基因、狼鲈科的dead end基因或慈鲷科的dead end基因中的至少一种的表达。

[0052] 在另一方面，本公开涉及对吗啉代低聚物的特异性序列的鉴定，所述吗啉代低聚物的特异性序列能够用于暂时抑制对生殖细胞发育必需的特异性基因的表达。在另一方面，本公开涉及能够暂时有效地抑制Dead end(对于生殖细胞存活必需的蛋白)的翻译并且特异性地中断性腺发育从而导致产生不育的鱼，例如鲑科鱼(鲑鱼和鳟鱼)、狼鲈科鱼(鲈鱼)和慈鲷科鱼(罗非鱼和观赏性的慈鲷科鱼)的特异性反义吗啉代低聚物。

[0053] 在另一个方面，本公开涉及特异性吗啉代低聚物5'-

CTGACTTGAACGCTCCTCCATTATC-3' (SEQ ID NO:1) 及其变体，例如5'-ACTTGAACGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO:2)，该变体能够暂时有效地抑制鲑科的dead end基因的表达，导致性腺发育衰退和/或完整且正常的性腺机能衰退，并最终导致产生绝育的鲑科鱼。因此，本公开的方法适用于所有鲑科鱼，其中包括但不限于大西洋鲑鱼、银鲑鱼、奇努克鲑鱼、狗鲑鱼(chum salmon)、红鲑鱼、粉鲑鱼和樱花钩吻鲑鱼，虹鳟鱼、小溪鳟鱼和褐鳟鱼，常见茴鱼和北极茴鱼，以及北极红点鲑。

[0054] 在另一个方面，本公开涉及特异性吗啉代低聚物5'-

GGCTCTGCTTGCTCTCCATCATCTC-3' (SEQ ID NO:3) 及其变体，该变体能够暂时有效地抑制狼鲈科的dead end基因的表达，导致性腺发育衰退和/或完整且正常的性腺机能衰退，并最终导致产生绝育的狼鲈科鱼。因此，本公开的方法适用于所有狼鲈科鱼，其中包括但不限于条纹狼鲈、金眼狼鲈、条纹狼鲈-金眼狼鲈杂交种、黄狼鲈、美洲白鲈、黄鲈、欧洲河鲈和鲈鱼-河鲈杂交种。

[0055] 在另一方面，本公开涉及特异性吗啉代低聚物5'-CTGGCTTTGCGTGTTTCCATCGTC-3' (SEQ ID NO:4) 及其变体，该变体能够暂时有效地抑制慈鲷科鱼的dead end基因的表达，导致性腺发育衰退和/或完整且正常的性腺机能衰退，并最终导致产生绝育的慈鲷科鱼。因此，本公开的方法适用于所有慈鲷科鱼和罗非鱼物种，其中包括但不限于尼罗罗非鱼、奥里罗非鱼、奥里亚罗非鱼-尼罗罗非鱼杂交种、莫桑比克罗非鱼以及其它食用和观赏性的慈鲷科鱼物种及它们的杂交种。

[0056] 吗啉代低聚物可以是所列举的序列的变体。这些改变可以包括但不限于其它修饰的核酸和包括上述列举的全部或部分序列的其它吗啉代低聚物。特别是包括反义低聚物,所述反义低聚物包括SEQ ID NOS:1、3和4中的一种或多种,基本上由SEQ ID NOS:1、3和4中的一种或多种组成,或者由SEQ ID NOS:1、3和4中的一种或多种组成。还包括这些反义低聚物的变体,所述变体包括与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中的任意一个具有80%、85%、90%、95%、97%、98%或99% (包括两个之间的所有整数) 的序列同一性或序列同源性的变体低聚物,和/或与这些序列有大约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸不同的变体,优选的是在与鱼卵接触时有效使鱼生殖绝育的变体。SEQ ID NO:2是SEQ ID NO:1的优选的变体。

[0057] 在这样的上下文中使用的在与鱼卵接触时有效使鱼生殖绝育的变体是指在本文公开的方法中使用该变体会导致鱼生殖绝育。在实施方式中,变体将有效地抑制感兴趣的dead end基因的表达。

[0058] 根据本公开的方法的实施方式,在包含能够有效抑制感兴趣的鱼的dead end基因的表达的反义吗啉代低聚物的浸渍介质中浸渍未受精的鱼卵(一个或多个卵)。该浸渍浴中反义吗啉代低聚物的浓度应足以使该反义吗啉代低聚物穿过鱼卵的卵壳,有效地转染所述卵。在实施方式中,这样的浓度通常为大约1至大约20 $\mu$ M,更优选为大约3至大约15 $\mu$ M,还更优选为大约5至大约10 $\mu$ M。

[0059] 该浸渍介质为含水介质,其可以进一步包含鱼卵巢液或含有盐、Tris (pH为7-9)、甘氨酸和/或0-30%的血清和蛋白酶抑制剂(例如抑肽酶或亮抑酶肽)的受精稀释剂。

[0060] 虽然浸渍未受精的卵或水活化前的受精卵以造成鱼或其它产卵水生动物令人满意的绝育所需要的时间将取决于鱼和其它产卵水生动物的种类,但是通常使鱼或其它产卵水生动物的卵在含有吗啉代低聚物的浸渍介质中浸渍大约2至大约96小时,更优选浸渍大约4至大约72小时,还更优选浸渍大约5至大约48小时。

[0061] 本公开进一步涉及用于生产用于水产养殖、水族贸易和控制入侵物种的生殖绝育的鱼和其它产卵水生动物的方法,其中,所述方法包括通过将与分子转运体缀合的化合物施用于卵或胚胎来中断性腺发育,通过该方法,所述化合物能够转染所述卵,即到达和进入未受精的卵或胚胎。化合物在卵或胚胎内的作用导致可育的性腺发育衰退,并最终导致产生绝育的成年鱼或其它产卵水生动物。所述分子转运体能够将与其缀合的化合物有效地运输穿过非常小的通道和孔,从而允许化学品、药物、肽等穿过卵壳并进入卵或胚胎中并到达靶组织。因此,通过这些方法,可以使未受精的卵或受精卵与吗啉代低聚物(或其它生物学有益的化合物)有效地接触,从而产生生殖绝育的鱼和其它产卵水生动物。

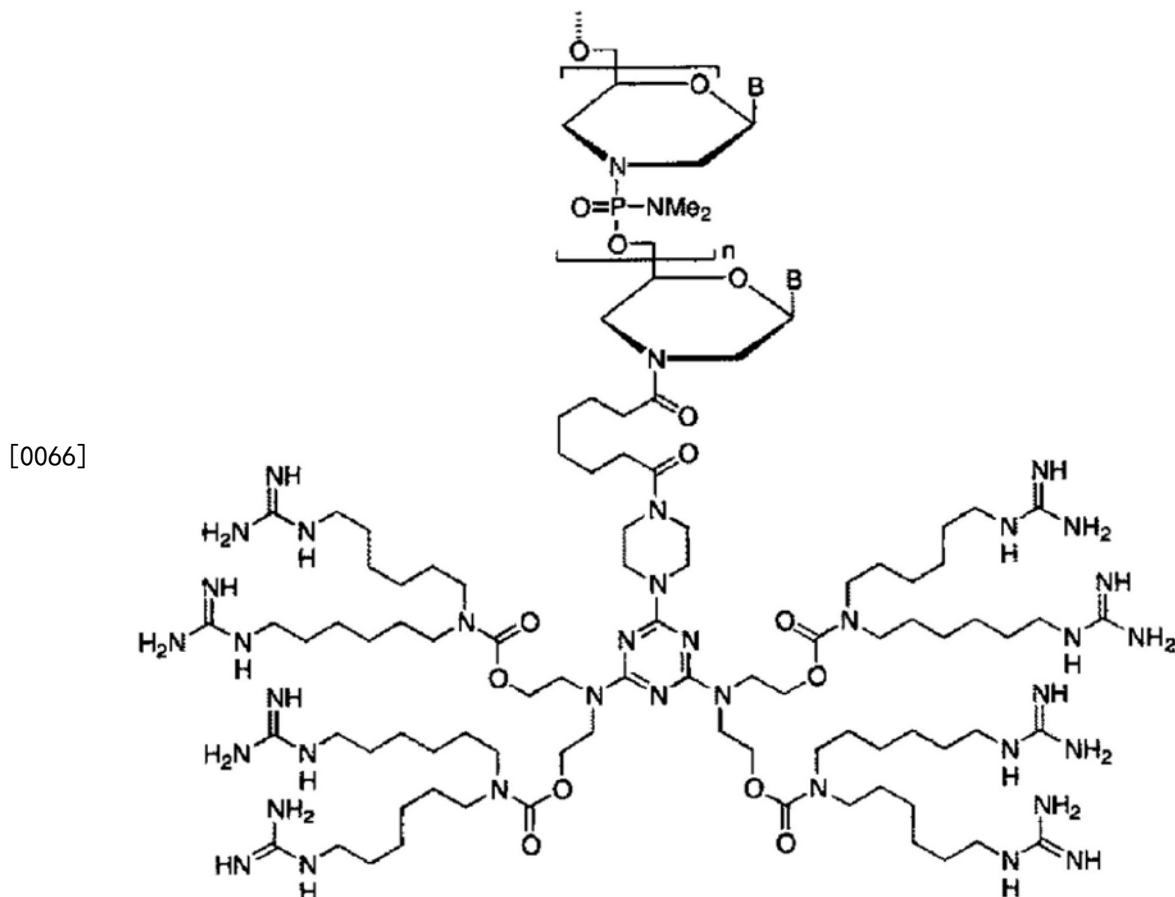
[0062] 在一个方面,本公开涉及通过如下方式产生生殖绝育的鱼和其它产卵水生动物的方法:将与分子转运体缀合的化合物施用于对未受精的鱼卵或胚胎,以中断促性腺激素释放激素(GnRH)细胞的发育和/或原始生殖细胞(PGC)的发育和迁移到和定居于胚胎的性腺,这导致性腺发育衰退和/或完整且正常的性腺机能在细胞或组织水平衰退,并最终导致产生绝育的鱼和其它产卵水生动物。

[0063] 分子转运体实体可以是任何能够与吗啉代低聚物缀合以将所述吗啉代低聚物递送至卵或胚胎中的化合物。

[0064] 在一方面,本公开涉及包括具有三嗪核部分的树枝状八胍的分子转运体,例如具

有美国专利号7,935,816中描述的类型分子转运体。这样的分子转运体可以为具有三嗪核部分的八胍树枝状聚合物,在现有技术中也称为“Vivo”。美国专利号7,935,816的公开内容特此通过引用以其整体并入本文。

[0065] 在如下的缀合物中示出了具有作为代表性的生物活性物质的吗啉基的示例性八胍树枝状聚合物转运体化合物:



[0067] 具有本公开的吗啉代低聚物的有用的具体的前体转运体化合物为2-[ (4-硝基苯基) 氧代羰基六亚甲基羰基哌嗪基] -4,6-双{二[二(三氟乙酰氨基己基)-氨基羰基氧代乙基]氨基}三嗪。

[0068] 本公开进一步涉及使用具有三嗪核的八胍树枝状聚合物作为分子转运体,以使得通过大的生物活性分子或生物学有益的化合物能够穿过卵的卵壳。这样的分子转运体对绒毛膜运输分子转运体化合物与吗啉代低聚物的缀合物有效。

[0069] 在本公开的另一个方面,提供用于将化合物递送至产卵水生动物的卵中的方法,该方法包括使未受精的卵或水活化前的卵与至少一种生物学有益的化合物接触。根据该方法,未受精的卵或水活化前的卵具有足以以有效地摄取至少一种生物学有益的化合物的渗透性。本文使用的“有效地摄取”是指生物学有益的化合物将对于意图通过使用其产生的有益效果是有效的。生物学有益的化合物可以选自由抗体、蛋白质、肽、RNA和DNA组成的组。

[0070] 在实施方式中,将以生物学有益的化合物与分子转运体化合物的缀合物来提供生物学有益的化合物,所述分子转运体化合物包括包含三嗪核部分的八胍树枝状聚合物。在这些实施方式中,所述分子转运体化合物对绒毛膜运输生物学有益的化合物有效,使得所述接触包括绒毛膜转染卵。在以缀合物形式提供生物学有益的化合物的实施方式中,所述

生物学有益的化合物为能够与包括包含三嗪核部分的八胍树枝状聚合物的分子转运体化合物形成缀合物的化合物。生物学有益的化合物可以选自由抗体、蛋白质、肽、RNA和DNA组成的组。

[0071] 在另一个方面,本公开提供了一种用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括使未受精卵或水活化前的受精卵与有效转染卵并使由该卵生产的个体生殖绝育的反义吗啉代低聚物接触,其中所述反义吗啉代低聚物与对绒毛膜运输缀合物有效的分子转运体化合物缀合。

[0072] 在另一个方面,该公开考虑到用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括使受精卵(或胚胎)与缀合到分子转运体化合物上的反义吗啉代低聚物接触,所述分子转运体化合物有效转染卵并使由该卵产生的个体生殖绝育。

[0073] 所选的低聚物可以中断大量胚胎中的GnRH细胞和/或PGC的发育、迁移和/或存活,导致大规模生产生殖绝育的成年鱼和其它产卵水生动物。本公开的方法也适用于以较小规模生产生殖绝育的成年鱼和其它产卵水生动物的单个胚胎。

[0074] 在实施方式中,所述方法包括与反义吗啉代低聚物缀合的分子转运体的制备和用途,所述反义吗啉代低聚物能够有效抑制鱼种和其它产卵水生动物的dnd、nanos或vasa的表达。在其它实施方式中,反义吗啉代低聚物能够有效抑制鲑科的dead end基因、狼鲈科的dead end基因或慈鲷科的dead end基因中的至少一种的表达。在进一步的实施方式中,反义吗啉代低聚物为能够有效抑制鱼种的dead end的表达的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或其变体。

[0075] 在一个实施方式中,提供了用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括在包含分子转运体化合物与反义吗啉代低聚物的缀合物的浸渍介质中浸渍未受精的或受精的鱼卵,所述反义吗啉代低聚物能够有效抑制对鱼和其它产卵水生动物的性腺发育必需的dead end基因或其它诸如nanos、vasa、gnrh或fsh受体等基因的表达。优选地,所述分子转运体是具有三嗪核的八胍树枝状聚合物。

[0076] 根据本公开的方法的具体方面,在包括反义吗啉代低聚物或反义吗啉代低聚物-转运体缀合物的含水介质中浸渍未受精的卵或水活化前的卵(一个或多个),所述反义吗啉代低聚物或反义吗啉代低聚物-转运体缀合物能够有效地抑制对鱼和其它产卵水生动物的性腺发育必需的dead end基因或其它基因的表达。浸渍浴中反义吗啉代低聚物的浓度应足以使反义吗啉代低聚物-转运体缀合物能够穿过卵的卵壳。在实施方式中,这样的浓度通常为大约1至大约20 $\mu$ M,更优选为大约3至大约15 $\mu$ M,甚至更优选为大约5至大约10 $\mu$ M。

[0077] 或者,该公开考虑到用于生产生殖绝育的产卵水生动物的方法,所述方法包括使受精卵与缀合到分子转运体化合物的反义吗啉代低聚物接触,所述分子转运体化合物有效转染受精卵并使由该受精卵产生的个体生殖绝育。所述接触包括绒毛膜转染卵。

[0078] 在本方法的实施方式中,通过在包含反义吗啉代低聚物-转运体缀合物的浸渍介质中进行浸渍来处理受精卵(胚胎),所述反义吗啉代低聚物-转运体缀合物能够有效抑制对感兴趣的鱼和其它产卵水生动物的性腺发育必需的dead end基因或其它基因的表达。浸渍浴中反义吗啉代低聚物的浓度应足以使反义吗啉代低聚物-转运体缀合物穿过受精卵的卵壳。这样的浓度将比浸渍未受精的卵所需的量高,因为在受精和水活化之后,所述卵的卵壳变得不可渗透,阻碍穿过进入卵中。通常,浸渍浴的用于浸渍胚胎的浓度为大约20至大约

80 $\mu$ M, 优选为大约40至大约60 $\mu$ M。

[0079] 在处理受精卵的实施方式中, 反义吗啉代低聚物能够有效抑制鲑科的dead end基因、狼鲈科的dead end基因或慈鲷科的dead end基因中的至少一种的表达。在进一步的实施方式中, 反义吗啉代低聚物为能够有效抑制鱼种和其它产卵水生动物的dead end的表达的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或其变体。

[0080] 在本公开的另一个方面, 提供了对中断鱼的原始生殖细胞迁移有效的组合物, 所述组合物包含选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4或能够有效抑制鱼的dead end基因表达的其变体, 如SEQ ID NO:2。在这个方面, 提供了用于处理鱼卵以使由鱼卵生产的鱼生殖绝育的组合物, 所述组合物包含反义吗啉代低聚物, 所述反义吗啉代低聚物包含选自由SEQ ID NOS:1-4的低聚物及在与鱼卵接触时有效使鱼生殖绝育的其变体组成的组的低聚物。优选在未受精的鱼卵的处理中使用该吗啉代低聚物组合物。

[0081] 本公开进一步涉及一种能够特异性中断性腺发育从而导致产生不育的鱼的新型化合物实体。该新型化合物实体包括与吗啉代反义低聚物缀合的八肽树枝状聚合物分子转运体, 所述吗啉代反义低聚物有效地抑制dead endmRNA的翻译(对于生殖细胞的存活必需的蛋白)。这样的缀合物可以用于处理未受精的卵或水活化前的卵, 或用于处理受精卵。

[0082] 这样的缀合化合物可以用于生产绝育的鱼和其它产卵水生动物。吗啉代低聚物化合物可以与分子转运体缀合, 以有效穿过卵壳进入胚胎。因此, 所述化合物能够特异性中断性腺发育, 导致产生不育的鱼和其它产卵水生动物。优选地, 所述分子转运体包括具有三嗪核的八肽树枝状聚合物, 并且所述低聚物包括选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4或各种在与鱼卵接触时有效使鱼生殖绝育的变体中的任意一种(例如SEQ ID NO:2)的反义吗啉代低聚物。

[0083] 将公认的是, 卵和/或胚胎与本公开的化合物、缀合物和组合物的接触可以以任何合适的方式(例如包括浸渍接触)进行, 或者可以通过不涉及浸渍的接触方法进行, 尽管即将公认的是浸渍接触提供高效并有效的接触技术, 该技术可用于生产生殖绝育的鱼和水生动物的大规模操作。可用在本公开的广泛实践中的非浸渍接触技术包括但不限于: 用于接触的喷雾或滴注方法、干式转移技术(dry transfer technique)(在该技术中, 使卵与载体或涂覆有或支撑有本公开的对生产生殖绝育的鱼有效的化合物、缀合物或组合物中的任意一种的表面接触)或其它使卵和/或胚胎与本公开的化合物、缀合物和/或组合物接触的技术。所述接触优选包括非注射式接触。

[0084] 参照如下的实施例, 进一步举例说明本公开的优点和特征, 所述实施例将不应理解为以任何方式限制本公开的范围, 而是应理解为举例说明本公开在其具体的应用中的具体实施方式。

#### [0085] 实施例1

[0086] 选择斑马鱼来首先举例说明本公开的方法, 因为它们的产生时间短并且每次交配产生的胚胎的数量大, 这样每天或每周容易获得。另外, 斑马鱼的胚胎是透明的(使得容易进行视觉观察)并且是强壮的。胚胎中的GnRH细胞、PGC和性腺的正常发育是在所有鱼中都发现的进化上保守的机制。因此, 本公开的方法适用于所有鱼种, 包括但不限于斑马鱼、鲤鱼、鳟鱼(trout species)、鲑鱼(salmon species)、欧鳊(breams)(包括海鲤和鲮鱼(porgies))、鲈鱼(包括海洋和淡水鲈鱼, 杂交鲈鱼等)、河鲈(黄鲈、美洲白鲈等)、鲇鱼、鳕

鱼以及其它用于捕获养殖的主要候选类型。

[0087] Vivo和dnd-MO

[0088] 使分子转运体,即具有三嗪核的树枝状八胍(也称为Vivo),与斑马鱼的dnd-MO,即5'-GCTGGGCATCCATGTCTCCGACCAT-3'(SEQ ID NO 5)缀合(zfdnd-MO-Vivo),并用于在水中的包含斑马鱼胚胎的浸渍中。在用20 $\mu$ M的zfdnd-MO-Vivo浸渍3小时后,在卵壳内部周围或胚胎的胚盘的表面周围发现了未经表征的聚集体(图3A)。在浸渍5小时后出现了更多的聚集体(图3B)。在用20 $\mu$ M的zfdnd-MO浸渍3小时(图3C)或5小时(图3D)的非缀合对照组中没有看见这些聚集体。结果表明,反义吗啉代低聚物与Vivo的缀合使缀合的化合物具有对卵壳起作用导致产生聚集体的能力。

[0089] 在受精后2天,荧光显微镜观察显示出,在用40或60 $\mu$ M的zfdnd-MO-Vivo浸渍的胚胎的生殖细胞误迁移并分化为其它细胞类型(图4A,图4B)。如所示的,斑马鱼dnd-MO-Vivo中断了斑马鱼的生殖细胞的发育。图4A显示,在对照鱼中,生殖细胞迁移到性腺区域并保持它们的形态(圆形细胞)。图4B显示,zfdnd-MO-Vivo处理造成生殖细胞的误迁移并最终分化为其它细胞类型。

[0090] 实施例2

[0091] 实施例1中处理的斑马鱼在发育为成年鱼后,对其进行检查。用40或60 $\mu$ M的zfdnd-MO-vivo对斑马鱼胚胎进行浴浸渍使得有效诱导在如图8中所示的最佳条件下处理的个体100%的绝育,而没有影响该鱼的任何其它生理特征(图5A和图5B)。如图5A和图5B中所示,斑马鱼的经dnd-MO-Vivo处理的胚胎发育为不育的雄性样成年鱼。图5A表明在经处理的成年鱼与野生型雄鱼之间观察到在外观或整体大小上无差异。图5B表明经zfdnd-MO-Vivo处理的鱼和未经处理的野生型雄鱼中3个月大的鱼(通过随机抽样n=12)的体重无显著差异。

[0092] 在另外的试验中,本公开的方法被成功地用于斑马鱼,且浸渍持续的时间被缩短至5至6小时,而没有影响绝育的效率(图6、图7A、图7B和图8)。在图6中,示出了zfdnd-MO-Vivo诱导的斑马鱼的绝育。对性腺组织进行的检查表明:(A)未经处理的雄鱼的精巢发育良好。(B)未经处理的雌鱼的卵巢发育良好。(C)经zfdnd-MO-Vivo处理的鱼的性腺发育为细丝样组织。显微照片(D-F)表明,(D)未经处理的雄鱼的精巢的精子形成活跃。(E)具有处于不同发育阶段的卵母细胞的未经处理的雌鱼的卵巢发育良好。(F)经处理的鱼的性腺似乎在发育中并被大量脂肪细胞包围着,而没有发达的性腺结构或生殖细胞。

[0093] 如图7A、图7B和图8中所示,斑马鱼的经dnd-MO-Vivo处理的胚胎发育为不育的成年鱼。在(7A)浸渍24小时和(7B)浸渍5至6小时的两种情况下,所有最初在受精后立即用60或40 $\mu$ M的zfdnd-MO-Vivo浸渍的胚胎都发育为不育的鱼。

[0094] 实施例3:

[0095] 为了不断优化本技术,使用未受精的卵进行浴浸渍,因为卵壳的渗透能力在受精之后和水活化之后逐渐降低。我们的结果表明,当用40 $\mu$ M荧光素标记的zfdnd-MO(dnd-MO-Flu)浸渍卵时,未受精的卵比在浸渍前经水活化1小时的卵摄取的dnd-MO-Flu多(图9)。如图9中所示,卵在水活化之前更具渗透性。在用40 $\mu$ M的zfdnd-MO-Flu浸渍5小时的情况下,(A)未受精的卵比(B)水活化前的卵摄取的zfdnd-MO-Flu多(更强的绿色荧光)。

[0096] 实施例4:

[0097] 当用鲑科鱼(鳟鱼)的dnd-MO+dnd-MO-Vivo(Ssdnd-MO+Ssdnd-MO-Vivo)浸渍受精

前的鲑科鱼的卵时,生殖细胞被除去(图10),其通过缺乏生殖细胞特异性标记基因 $vasa$ 的表达来指示。如图10中所示,鲑科鱼(鳟鱼)的卵在受精前用如下鲑科鱼的 $dnd-MO$ 浸渍48小时:A:对照;B:10 $\mu M$   $Ssdnd-MO$ ;C:10 $\mu M$   $Ssdnd-MO$ +1 $\mu M$   $Ssdnd-MO-Vivo$ ;D:10 $\mu M$   $Ssdnd-MO$ +2 $\mu M$   $Ssdnd-MO-Vivo$ 。孵化完成后不久,切掉身体的中间部分,并用于RNA提取和RT-PCR以检测 $vasa$ 的表达。来自C组的一条鱼和来自D组的一条鱼似乎具有极低的 $vasa$ 表达,这表明对减少生殖细胞丰度的可能影响。RT:反转录。

[0098] 如本文所述,所述方法通常适用于养殖的鱼和水生产卵动物,因为生产绝育的养殖的物种是希望的。因此,本发明的方法适用于任何养殖的鱼种和水生产卵动物,特别是适用于商业上重要的养殖物种。

[0099] 尽管在本文中已经参照具体的方面、特征和示例性实施方式阐述了本公开,但是应懂得的是,本公开的实用性并不因此是有限的,而是扩大至并包括许多其它变形、修改和供选择的实施方式,如基于本文的描述将浮现于本公开的领域中的普通技术人员的心中。相应地,随后要求保护的发明旨在以更广义的方式理解和解释为包括其精神和范围内的所有这样的变形、修改和供选择的实施方式。

[0100] 工业实用性

[0101] 本公开所述的方法和化合物产生生殖绝育的鱼和水生产卵动物。使养殖的鱼和水生产卵动物绝育(诱导的不育)通过提高食品能量向肌肉生长而不是性腺发育的转化来提高它们的生长率。另外,如果从水产养殖作业逃到环境中,养殖的生殖绝育的鱼和产卵水生动物(包括驯养的、非本土的或遗传修饰的物种)将不能繁殖或不能与野生种进行品种间杂交。这将有助于生物遏制,并防止野生群体的基因污染和/或在野生环境中对驯养的、非本土的或养殖的遗传修饰的鱼和水生产卵动物的建立。



## 序列表

	<110> 马里兰大学巴尔的摩县	
	<120> 生产不育的鱼和产卵水生动物及递送化合物至卵和胚胎中的方法	
	<130> 4451-267-PCT	
	<140> 尚未指定	
	<141> 2014年11月14日	
	<150> US 61/904,652	
	<151> 2013年11月15日	
	<150> US 61/968,458	
	<151> 2014年3月21日	
	<150> US 62/050,815	
	<151> 2014年9月16日	
	<160> 5	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 大西洋鲑鱼 (Salmo salar)	
	<400> 1	
	ctgaattgaa cgctcctcca ttatc	25
[0001]	<210> 2	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 大西洋鲑鱼	
	<400> 2	
	acttgaacgc tcctccat	18
	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 条纹狼鲈 (Morone saxatilis)	
	<400> 3	
	ggctctgctt gctctccatc atctc	25
	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 尼罗罗非鱼 (Oreochromi niloticus)	
	<400> 4	
	ctggctttgc gtgttttcca tcgtc	25
	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 斑马鱼 (Danio rerio)	
	<400> 5	
	gctgggcac ccatgtctccg accat	25

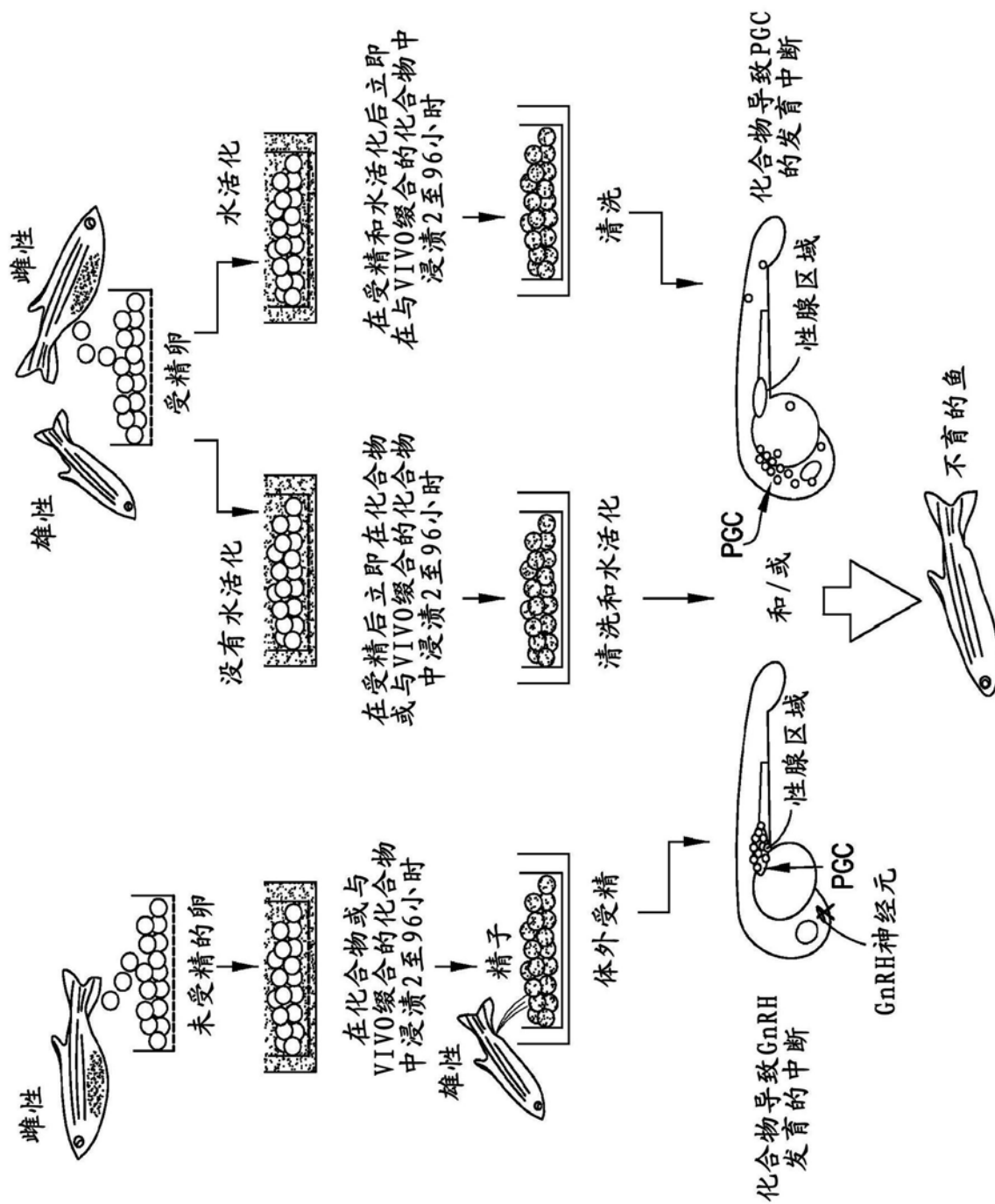


图1

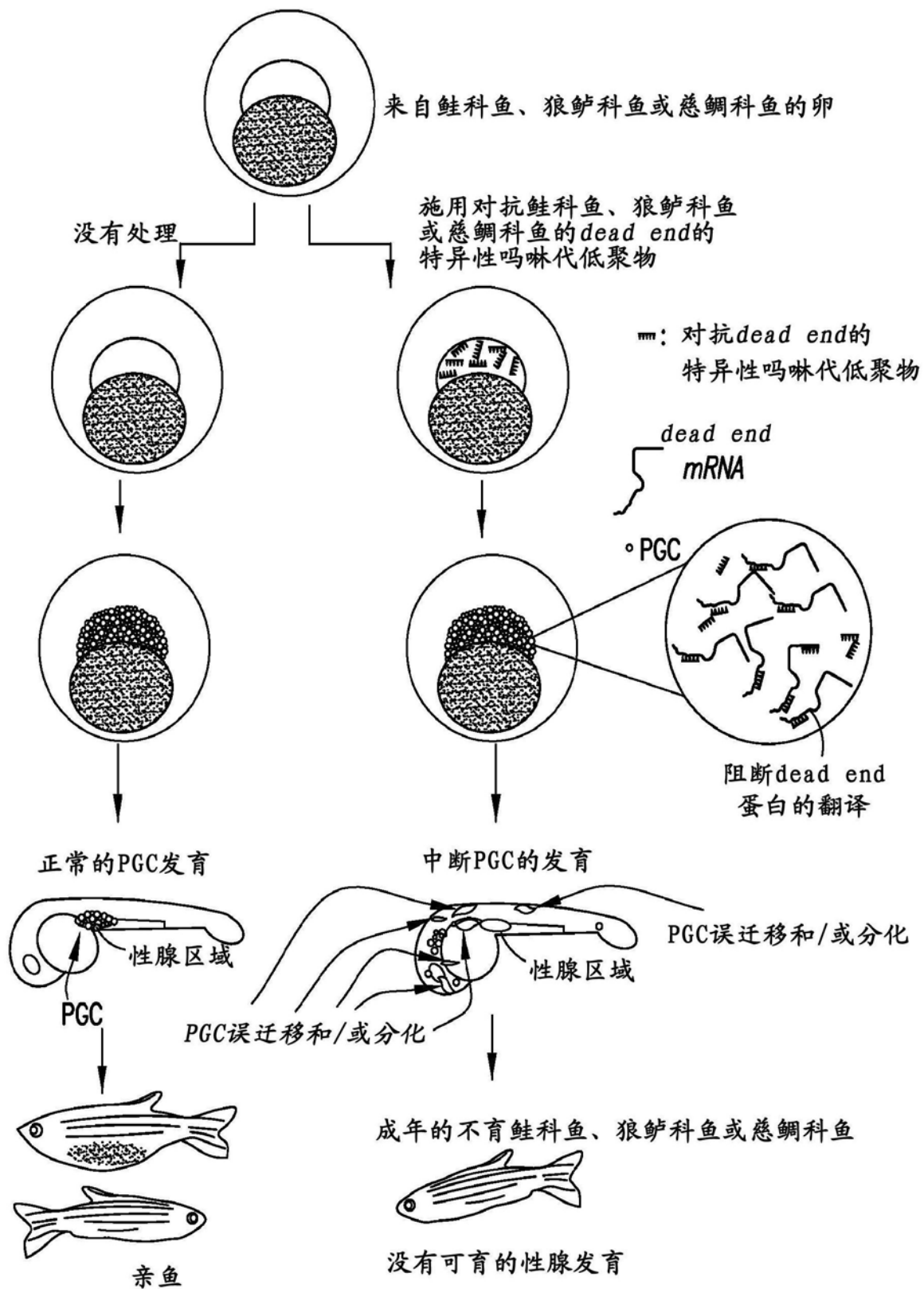


图2

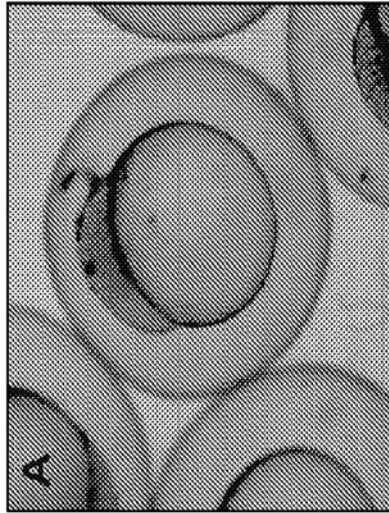


图3A

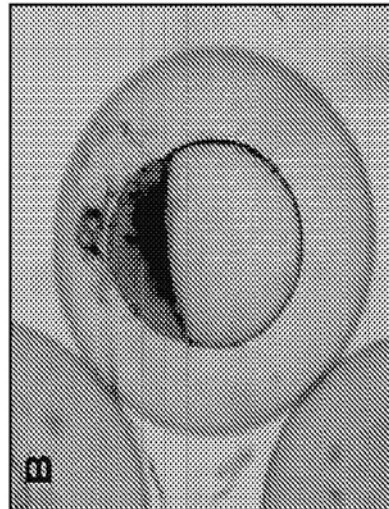


图3B

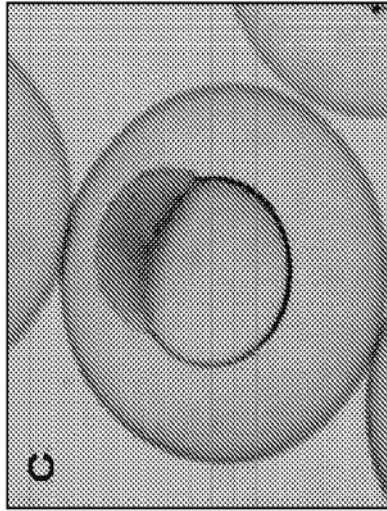


图3C

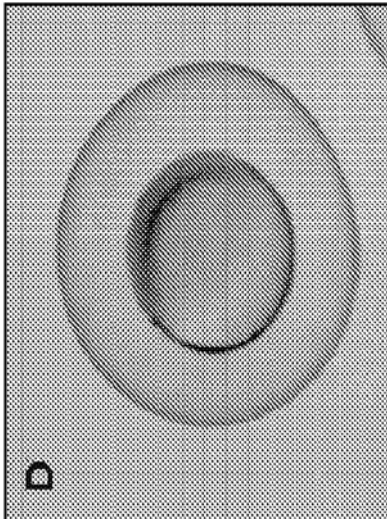


图3D

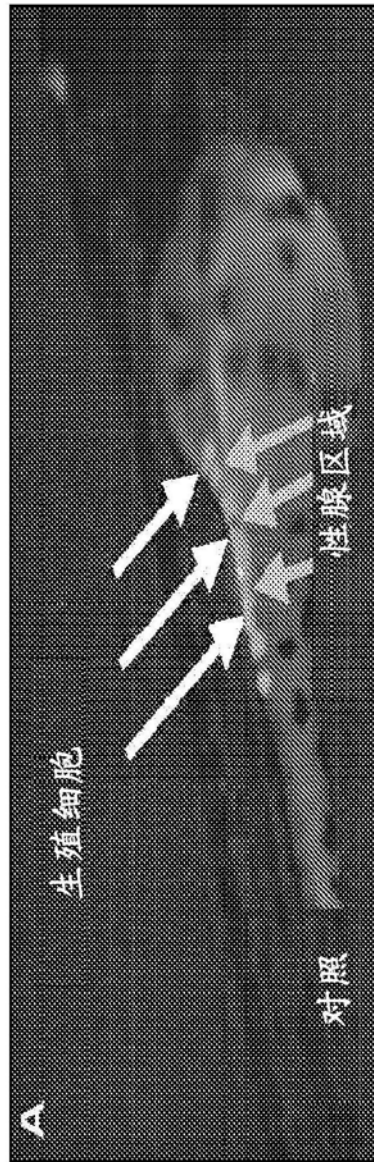


图4A

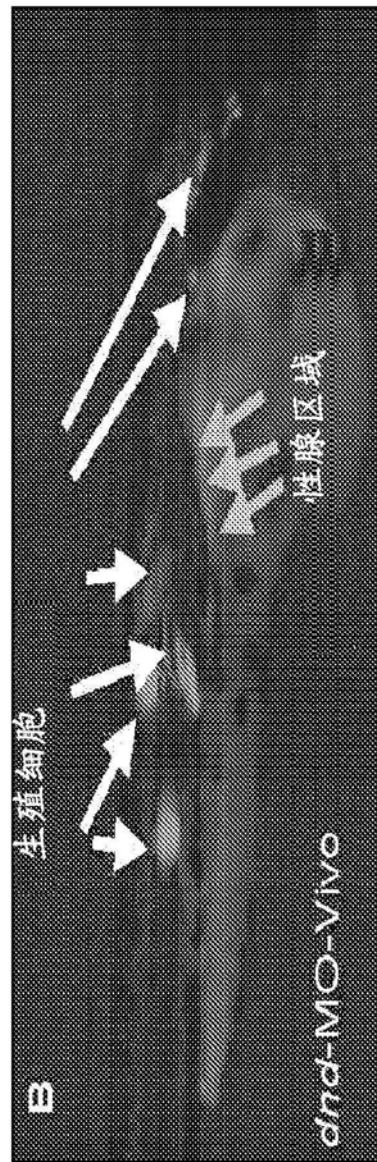


图4B

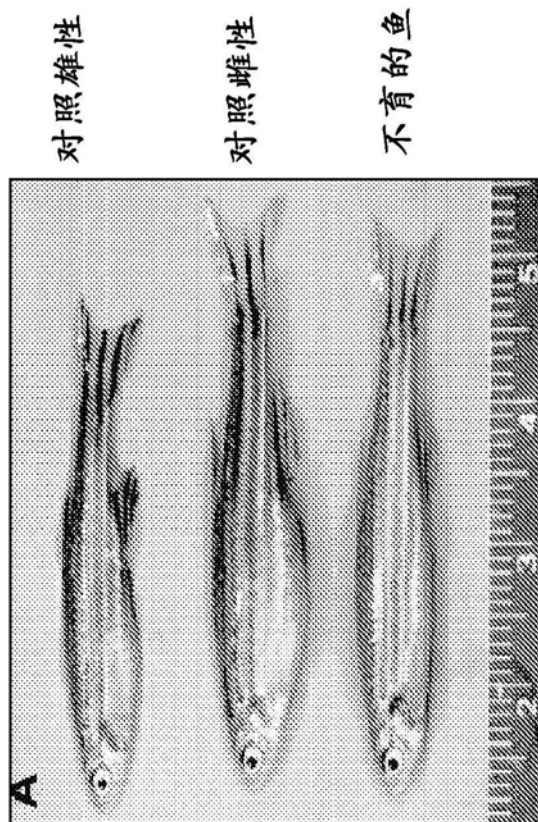


图5A

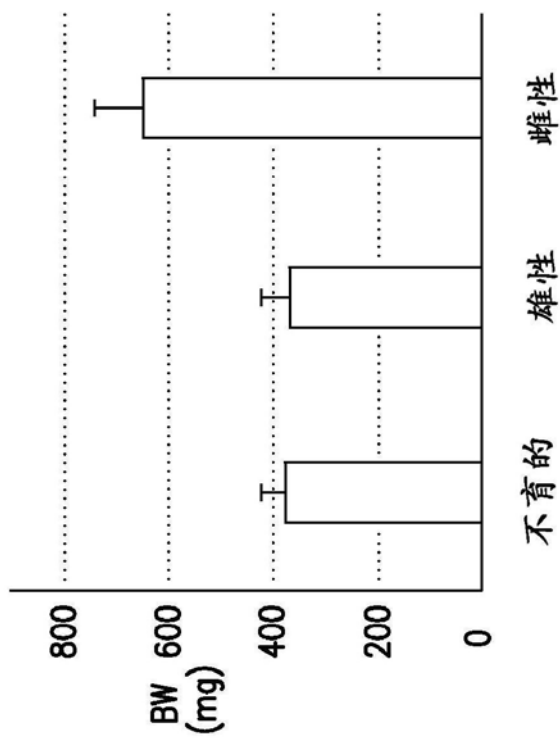


图5B



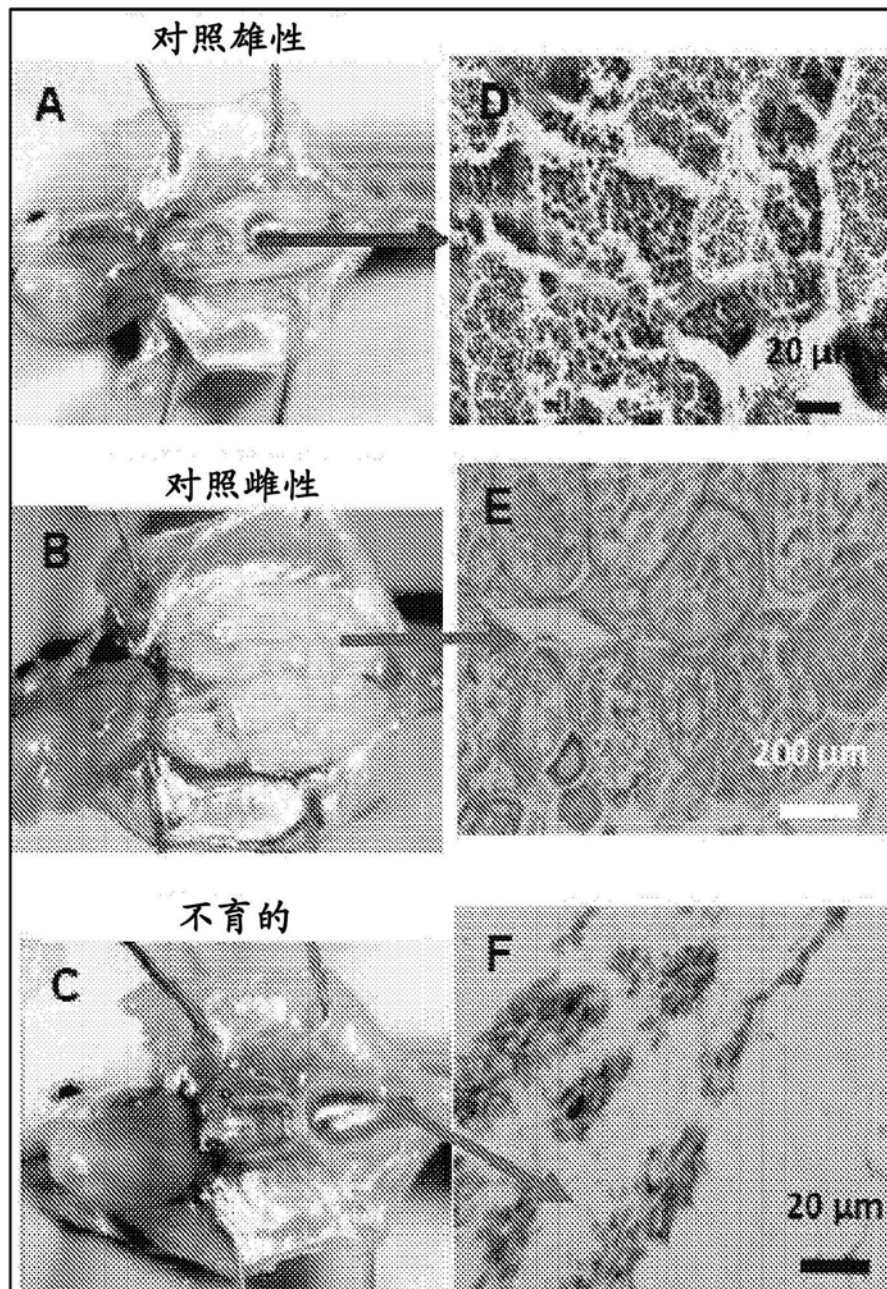


图6

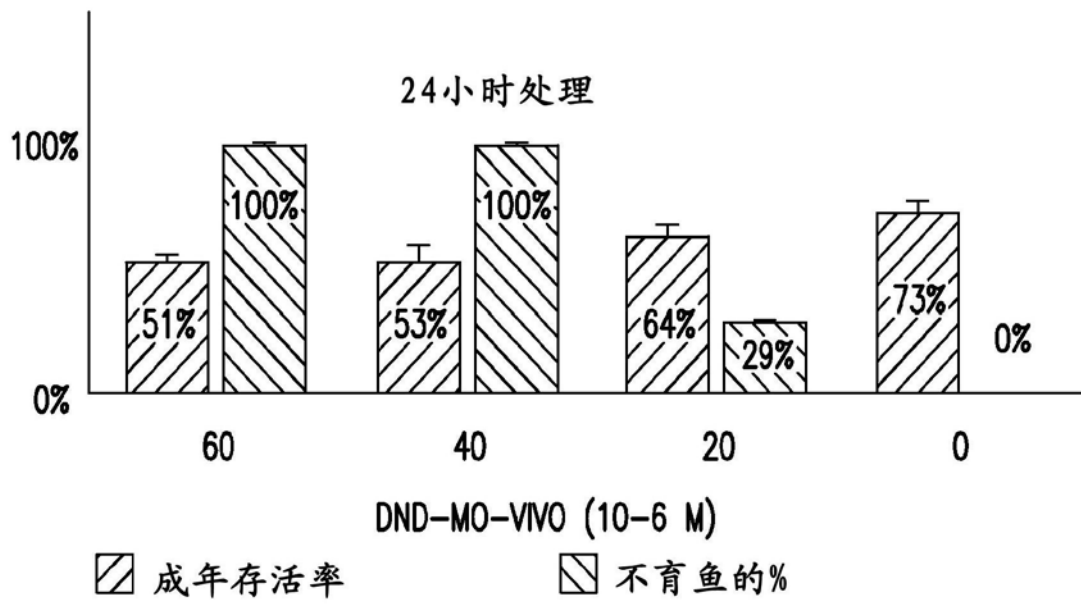


图7A

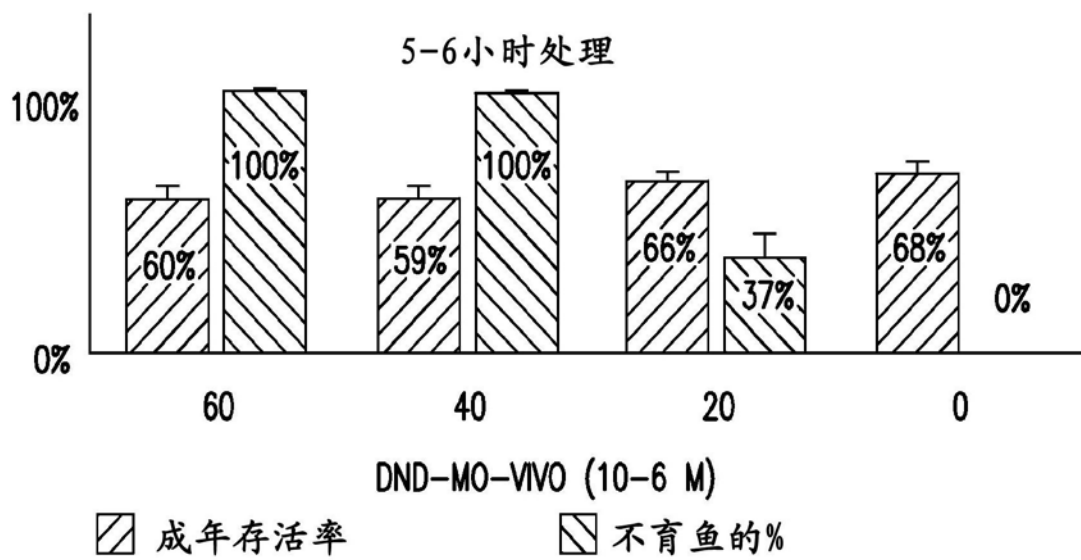


图7B

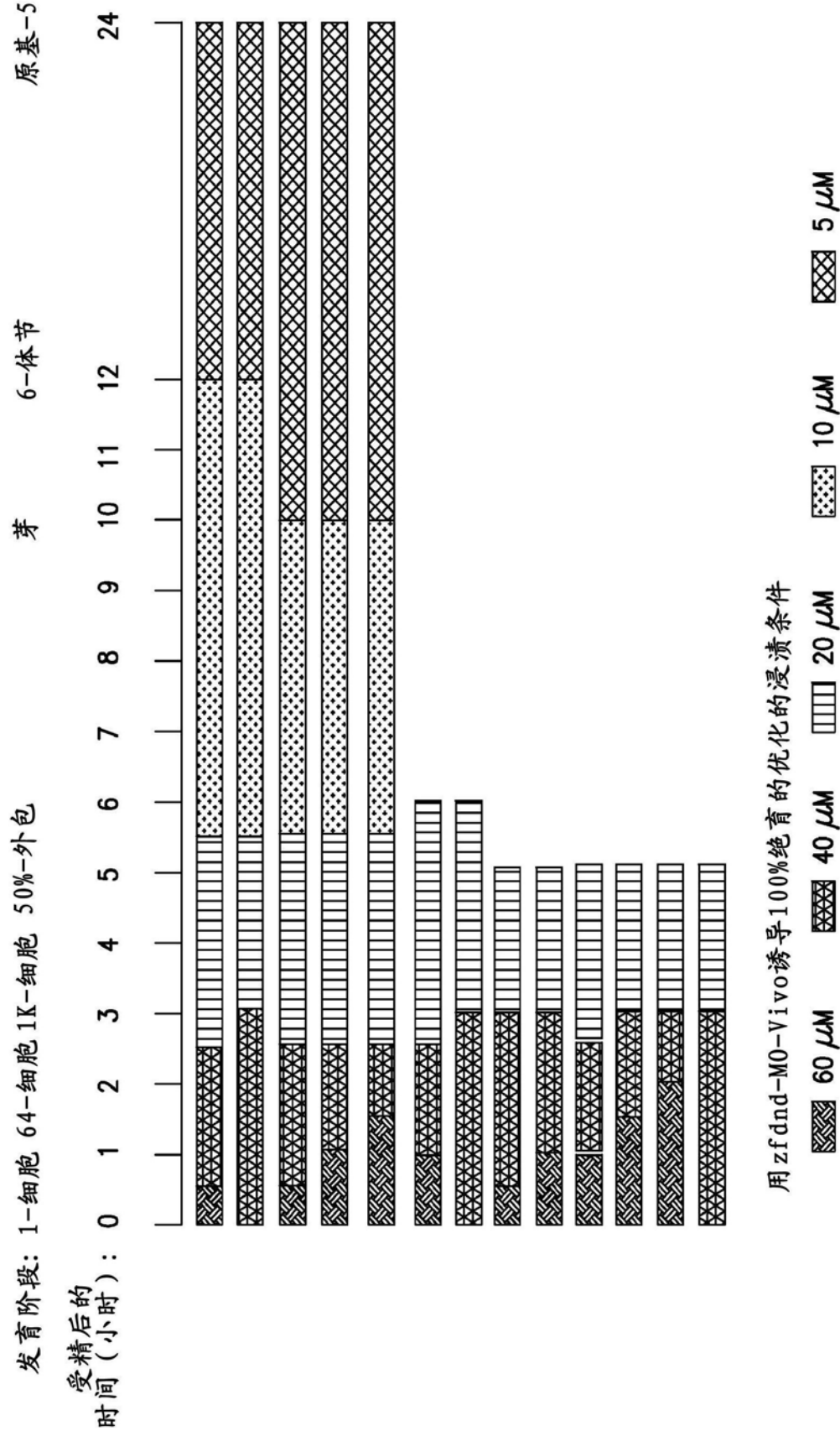


图8

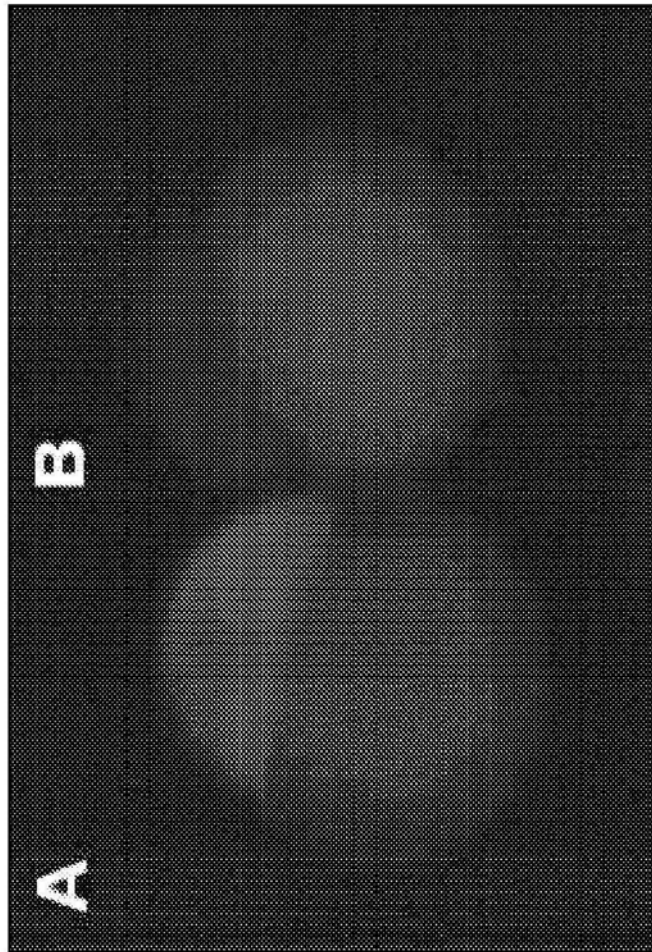


图9

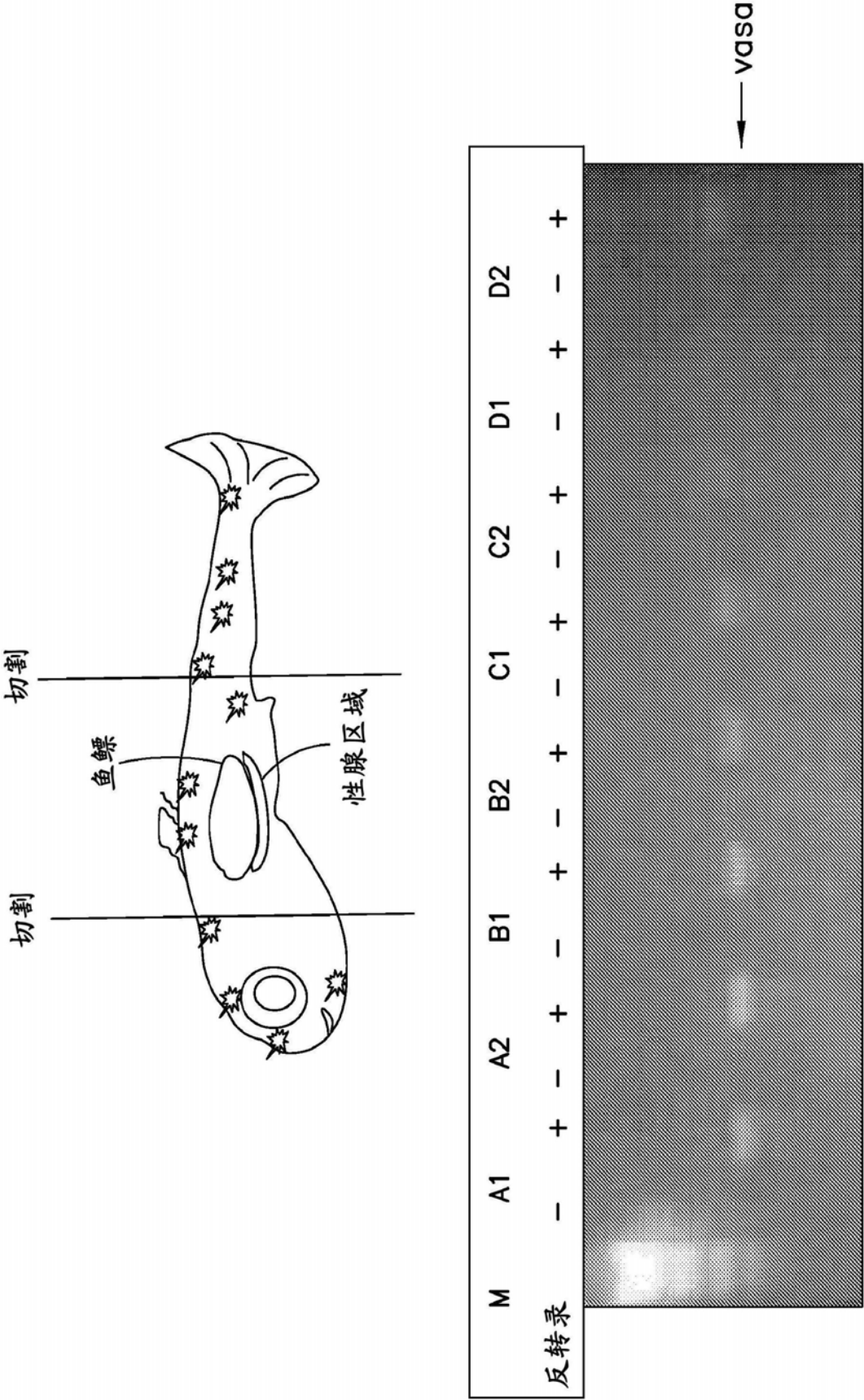


图10