

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018年11月29日(29.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/214187 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01) *C12N 15/55* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/088329
- (22) 国际申请日: 2017年6月14日(14.06.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201710369451.6 2017年5月23日(23.05.2017) CN
- (71) 申请人: 中国科学院南海海洋研究所(SOUTH CHINA SEA INSTITUTE OF OCEANOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省广州市海珠区新港西路164号, Guangdong 510301 (CN).
- (72) 发明人: 任春华(REN, Chunhua); 中国广东省广州市海珠区新港西路164号, Guangdong 510301 (CN)。江晓(JIANG, Xiao); 中国广东省广州市海珠区新港西路164号, Guangdong 510301 (CN)。陈廷(CHEN, Ting); 中国广东省广州市海珠区新港西路164号, Guangdong 510301 (CN)。黄文(HUANG, Wen); 中国广东省广州市海珠区新港西路164号, Guangdong 510301 (CN)。胡超群(HU, Chaoqun); 中国广东省广州市海珠区新港西路164号, Guangdong 510301 (CN)。
- (74) 代理人: 广州科粤专利商标代理有限公司(GUANGZHOU KEYUE I.P. LAW OFFICE); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院23-1栋616室, Guangdong 510070 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) **Title:** SNP MARKER RELATED TO LOW-SALT TOLERANCE CHARACTERISTIC OF *LITOPENAEUS VANNAMEI*, AMPLIFICATION PRIMER THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的SNP标记、扩增引物及其应用

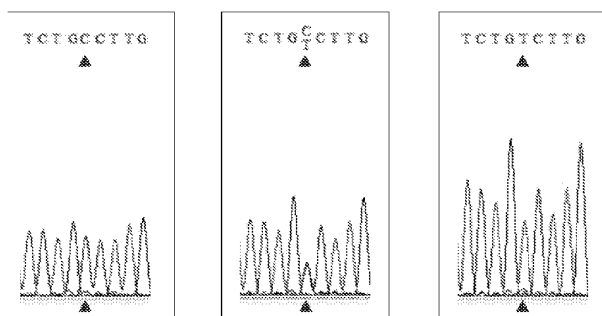


图 1

(57) **Abstract:** Disclosed are an SNP marker related to the low-salt tolerance characteristic of *Litopenaeus vannamei*, an amplification primer therefor, and an application thereof. A primer is designed on the basis of the mRNA sequence (GenBank: KF765670.1) of the Na₂K-ATPase α subunit of *Litopenaeus vannamei* obtained from NCBI, and the genomic DNA of low-salt tolerant and low-salt intolerant *Litopenaeus vannamei* are used as templates respectively for PCR amplification to obtain PCR products with a length of 533 bp respectively. The sequencing results are compared and analyzed. A total of 11 SNP sites are detected in this sequence. An SNP marker related to low-salt tolerance is identified by correlative analysis of the genotypes of these templates at each SNP site.

(57) **摘要:** 公开了一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的SNP标记、扩增引物及其应用。以从NCBI中获得的凡纳滨对虾Na₂K-ATPase α 亚基的mRNA序列(GenBank: KF765670.1)为基础设计引物, 分别以耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾的基因组DNA作为模板进行PCR扩增, 分别获得长度为533bp的PCR产物。对测序结果进行比对分析, 在该段序列中共检测到11个SNP位点, 通过对这些模板在每个SNP位点的基因型的关联分析, 确定了1个与耐低盐相关的SNP标记。



WO 2018/214187 A1

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记、扩增引物及其应用

技术领域：

本发明涉及水产生物技术领域，具体涉及一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的
5 的 SNP 标记、扩增引物及其应用。

背景技术：

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是全世界产量最大的养殖对虾。近年来，
凡纳滨对虾淡水养殖发展很快，养殖产业对凡纳滨对虾耐低盐优良品种的需求逐
10 渐加大。因此，很多科研机构和对虾公司开始着手进行凡纳滨对虾耐低盐优良品
种的选育工作。

在国际上，以分子标记为基础的分子标记辅助选育技术已成为当代水产育种的
的关键技术。单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)即 SNP，
是指由基因组单核苷酸变异（包括碱基转换、颠换、单碱基插入或缺失等）所引
15 起的 DNA 序列多态性，是最新的第三代 DNA 分子标记。因其具有数量巨大、
分布广泛、遗传稳定、测定准确简便、能显示其他技术无法检测的隐藏多态性以
及可能与基因功能相关的众多优点，在分子标记辅助育种中得到广泛应用。

Na, K-ATPase 基因是甲壳动物重要的渗透压调节基因，研究表明 Na,
K-ATPase 基因是一个与凡纳滨对虾盐度抗逆相关的功能基因。因此，本发明针
20 对凡纳滨对虾 Na, K-ATPase α 亚基开发与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标
记，以期用于凡纳滨对虾耐低盐优良品种的辅助选育，从而加快凡纳滨对虾耐低
盐优良品种的选育进程。

发明内容：

25 本发明的目的是提供一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记、扩增
引物及其应用。用于凡纳滨对虾耐低盐优良品种的辅助选育，从而加快凡纳滨对
虾抗逆优良品种的选育进程。

为实现上述发明目的，本发明以耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾的基因组
DNA 为模板，通过 PCR 扩增和测序来检测这些模板在 Na, K-ATPase α 亚基一段

基因组序列所包含的每个 SNP 位点的基因型，通过关联分析方法确定耐低盐相关的 SNP 标记，并提供 SNP 位点扩增引物，建立凡纳滨对虾耐低盐优良品种分子标记辅助选育的技术体系，为快速选育凡纳滨对虾耐低盐优良品种奠定基础。

本发明的第一个目的是提供一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记，
5 所述的 SNP 标记位于 SEQ ID NO.2 所示序列自 5'端起第 379 位碱基处，碱基为 C 或 T。SEQ ID NO.2 序列在 379 bp 处的 Y 代表 C 或 T，斜体部分代表内含子序列。

本发明的第二个目的是提供一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记的扩增引物，包括以下引物：

10 Lv-F: 5'-TGATGAGCACAAGGTCCCA-3';

Lv-R: 5'-GAGAAACCACCGAAGAGG-3'。

本发明的第三个目的是提供上述的与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记在凡纳滨对虾分子标记辅助育种中的应用。

本发明的第四个目的是提供一种耐低盐凡纳滨对虾品种的选育方法，包括以下
15 步骤：

a、提取待测凡纳滨对虾基因组 DNA；

b、采用上述的扩增引物 Lv-F 和 Lv-R 对待测凡纳滨对虾基因组 DNA 进行
PCR 扩增；

c、对扩增产物进行测序，确定所述的 SNP 标记的基因型，选择 TT 基因型
20 的个体作为后备亲本进行耐低盐凡纳滨对虾品种育种。

所述的 PCR 扩增，其反应体系优选为 25 μ L，包括：不含 Mg^{2+} 的 10 \times PCR buffer 2.5 μ L、25 mM $MgCl_2$ 2.0 μ L，10 mM dNTP 0.5 μ L、5 U/ μ L PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 0.2 μ L、10 μ M 正向引物 0.5 μ L、10 μ M 反向引物 0.5 μ L、DNA 模板 12.5 ng，其余由无菌水补足至 25 μ L。

25 所述的 PCR 扩增，其反应程序优选为：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟；95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟，共 35 个循环；72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 分钟。

本发明以从 NCBI 中获得的凡纳滨对虾 Na, K-ATPase α 亚基的 mRNA 序列 (GenBank: KF765670.1) 为基础设计引物，分别以耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增，分别获得长度为 533 bp 的 PCR 产物，

其中包含 1 个长度为 353 bp 的内含子。对测序结果进行比对分析，在该段序列中共检测到 11 个 SNP 位点，通过对这些模板在每个 SNP 位点的基因型的关联分析，确定了 1 个与耐低盐相关的 SNP 标记。本发明建立了凡纳滨对虾耐低盐优良品种分子标记辅助选育的技术体系，为快速选育凡纳滨对虾耐低盐优良品种奠定基础。

附图说明：

图 1 是 Lv-HR08 位点的基因型峰图。

具体实施方式：

以下结合实施例对本发明作进一步的说明，但并不局限于此。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法或者按照试剂盒说明书进行。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径获得。克隆测序和引物合成工作由上海生物工程有限公司完成。

1、耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾样本的收集

1.1 淡水应激试验

将体长 2 厘米左右的凡纳滨对虾虾苗放入淡水中，记录不同时间虾苗的死亡数量及应激 10 小时后的存活数量。结果见下表 1：

表 1 淡水应激试验结果

试验虾苗数量（条）	426
应激 1 h 死亡数量（条）	0
应激 2 h 死亡数量（条）	186
应激 4 h 死亡数量（条）	137
应激 7 h 死亡数量（条）	31
应激 10 h 死亡数量（条）	19
应激 10 h 存活数量（条）	53

1.2 耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾样本的收集

取应激 10 h 后仍存活的凡纳滨对虾虾苗作为耐低盐样本，应激 2 h 死亡的虾苗作为不耐低盐样本。

2. 耐低盐 SNP 标记的开发

2.1 耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾基因组 DNA 的提取

选取耐低盐和不耐低盐虾苗各 48 条，分别取肌肉组织，采用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司，北京）提取凡纳滨对虾基因组 DNA，操作步骤严格按照说明书进行。基因组 DNA 定量采用 NanoDrop™ 2000 分光光度计完成，质量采用琼脂糖电泳来检测。

2.2 PCR 引物设计

以从 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中获得的凡纳滨对虾 Na, K-ATPase α 亚基的 mRNA 序列 (GenBank: KF765670.1) 为基础，设计引物扩增 Na, K-ATPase α 亚基的一段基因组序列。引物设计的要求为：引物长度 18-22 bp, GC 含量为 40-60%，Tm 值为 50-62℃，上下游引物的 Tm 值之差不大于 5，并尽量避免引物二聚体、发夹结构及错配等。引物序列如下：

Lv-F (468-486): 5'-TGATGAGCACAAGGTCCCA-3';

Lv-R (647-630): 5'-GAGAAACCACCGAAGAGG-3'.

括号中的数字代表引物中的核苷酸在 Na, K-ATPase α 亚基 mRNA 序列中的位置。

2.3 PCR 扩增和测序

从步骤 2.1 提取的凡纳滨对虾基因组 DNA 中随机选取一份作为模板，采用步骤 2.2 设计的引物 Lv-F/Lv-R 对该 DNA 进行 PCR 扩增，反应体系 25 μ L，包括：10 \times PCR buffer (without Mg²⁺) 2.5 μ L、MgCl₂ (25 mM) 2.0 μ L，dNTP (10 mM) 0.5 μ L、LA Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L、正向引物 (10 μ M) 0.5 μ L、反向引物 (10 μ M) 0.5 μ L、DNA 模板 (25 ng/ μ L) 0.5 μ L、无菌水 18.3 μ L。反应程序为：95℃预变性 3 分钟；95℃变性 30 秒，55℃退火 30 秒，72℃延伸 2 分钟，共 35 个循环；72℃再延伸 10 分钟。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖电泳检测，显示该引物对能稳定扩增出单一条带。对扩增产物进行克隆测序，结果显示扩增产物长度为 533 bp，除包含目的核苷酸序列外，还包一段长度为 353 bp 的含内含子序列，该序列的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示 (命名为 SEQIDPGLv-NK, SEQ ID NO.1 所示序列中的斜体部分代表内含子序列)。

2.4 SNP 位点的筛查及 SNP 位点基因型分析

以步骤 2.1 提取的耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾基因组 DNA 为模板, 采用步骤 2.2 所述引物 Lv-F/ Lv-R 进行 PCR 扩增。反应体系和反应程序与步骤 2.3 中所述基本一致, 不同点在于: 用于筛选 SNP 位点的 PCR 体系中以高保真 PCR 酶 (PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase) 替代了 LA Taq 酶, 72℃ 延伸由 2 分钟降

5 为 1 分钟。PCR 扩增产物先用 2% 琼脂糖电泳进行检测, 然后采用 3730XL 测序仪进行测序。将所有扩增产物的测序峰图进行比对分析以筛查 SNP 位点, 共检测到 11 个 SNP 位点 (见表 2)。通过 SPSS 16.0 中的非参数检验方法 (卡方检验, χ^2) 对耐低盐和不耐低盐组中各个 SNP 位点的基因型频率进行差异检验, 设置限制性的阈值 $P=0.05$ 。结果显示, 上述 SEQIDPGLv-NK 序列 379 bp 处的 SNP

10 位点的基因型在耐低盐和不耐低盐凡纳滨对虾中差异显著 ($P<0.05$), 该 SNP 位点 (位于 SEQ ID NO.2 所示序列自 5' 端起第 379 位碱基处, 该 SNP 标记为凡纳滨对虾耐低盐标记, 斜体部分代表内含子序列, SNP 位点为加粗的混合碱基 Y, Y 代表 T 或 C) 具有 CC、CT 和 TT (峰图见图 1) 三种基因型, 其中 TT 基因型仅在耐低盐凡纳滨对虾中检测到 (表 2), 提示 TT 基因型为耐低盐优势基因型,

15 可作为凡纳滨对虾耐低盐分子标记, 用于凡纳滨对虾耐低盐优良品种的辅助选育。

表 2 SEQIDPGLv-NK 序列中的 SNP 位点、SNP 位点的基因型、频率及差异检

验

编号	核苷酸位置	基因型	耐低盐样本数/ 基因型频率	不耐低盐样本数/ 基因型频率	χ^2	P
Lv-HR01	205	A/G	39/0.813	40/0.792	0.071	0.789
		G/G	9/0.187	8/0.208		
Lv-HR02	244	T/T	34/0.708	39/0.813	1.429	0.232
		C/T	14/0.292	9/0.187		
Lv-HR03	285	A/A	34/0.708	40/0.833	2.123	0.145
		A/G	14/0.292	8/0.167		
Lv-HR04	306	C/C	45/0.938	47/0.979	1.043	0.307
		A/C	3/0.062	1/0.021		
Lv-HR05	318	C/C	44/0.917	47/0.979	1.899	0.168
		C/T	4/0.083	1/0.021		

Lv-HR06	329	A/T	26/0.541	19/0.396	2.207	0.332
		A/A	14/0.292	20/0.417		
		T/T	8/0.167	9/0.187		
Lv-HR07	346	A/A	36/0.75	40/0.833	1.011	0.315
		A/T	12/0.25	8/0.167		
Lv-HR08	379	C/C	31/0.646	26/0.541	8.729	0.013
		C/T	17/0.354	14/0.292		
		T/T	0/0	8/0.167		
Lv-HR09	393	AA	33/0.688	40/0.833	2.802	0.094
		A/G	15/0.312	8/0.167		
Lv-HR10	398	C/C	44/0.917	47/0.979	1.899	0.168
		C/T	4/0.083	1/0.021		
Lv-HR11	435	T/T	28/0.584	23/0.479	1.147	0.563
		C/T	16/0.333	19/0.396		
		C/C	4/0.083	6/0.125		

注：第二列中的数字表示 SNP 位点在 SEQIDPGLv-NK 序列中的位置

序列表

<110> 中国科学院南海海洋研究所

<120> 一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记、扩增引物及其应用

<160> 2

5 <210> 1

<211> 533

<212> DNA

<213> 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)

<400> 1

10 tgatgagcac aaggtcccaa ttgaggaact ctttcaacgt ctcactgttaa cccagacac 60
 agtaggttta cccgagttct ttgtagtata cttggtatat tgcctaaatt aagagtattg 120
 gtaagattta atccaatagc gacaggggaag gaatTTTggg aaagtgggtt aaggagaagt 180
 gtacattagc gtgcacagct ctgc**g**cattg ggtgattctc cagctatTTT ttgtaattac 240
 ttg**t**tatgat ttaatctaaa atcacctgtc gctaataggt taga**a**tagat cTTtaagagt 300
 15 agata**c**acgc agataacc**c**ct caaaaata**a**aa tcaaatgtaa ttctt**a**cttg tgtactTTaa 360
 ttacaaggtg tTTTtctg**t**c ttgaacatga ct**a**acc**a**ctc ctataacctt gcagggtceta 420
 tcacaaagtg aggct**a**agcg cegtattgaa cgagatgggc cgaatgctct taccceaccc 480
 aagcagactc cagaatgggt caagttctgc aaaaacctct teggtggttt ctc 533

<210> 2

20 <211> 533

<212> DNA

<213> 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)

<400> 2

tgatgagcac aaggtcccaa ttgaggaact ctttcaacgt ctcactgttaa cccagacac 60
 25 agtaggttta cccgagttct ttgtagtata cttggtatat tgcctaaatt aagagtattg 120
 gtaagattta atccaatagc gacaggggaag gaatTTTggg aaagtgggtt aaggagaagt 180
 gtacattagc gtgcacagct ctgc**g**cattg ggtgattctc cagctatTTT ttgtaattac 240
 ttgTTtatgat ttaatctaaa atcacctgtc gctaataggt tagaatagat cTTtaagagt 300
 agata**c**acgc agataacc**c**ct caaaaata**a**aa tcaaatgtaa ttctt**a**cttg tgtactTTaa 360
 30 ttacaaggtg tTTTtctg**y**c ttgaacatga ct**a**acc**a**ctc ctataacctt gcagggtceta 420
 tcacaaagtg aggct**a**agcg cegtattgaa cgagatgggc cgaatgctct taccceaccc 480
 aagcagactc cagaatgggt caagttctgc aaaaacctct teggtggttt ctc 533

权利要求书

1、一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记，其特征在于，所述的 SNP 标记位于 SEQ ID NO.2 所示序列自 5'端起第 379 位碱基处，碱基为 C 或 T。

5 2、一种与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记的扩增引物，其特征在于，包括以下引物：

Lv-F: 5'-TGATGAGCACAAAGGTCCCA-3';

Lv-R: 5'-GAGAAACCACCGAAGAGG-3'。

3、权利要求 1 所述的与凡纳滨对虾耐低盐性状相关的 SNP 标记在凡纳滨对
10 虾分子标记辅助育种中的应用。

4、一种耐低盐凡纳滨对虾品种的选育方法，其特征在于，包括以下步骤：

a、提取待测凡纳滨对虾基因组 DNA；

b、采用权利要求 2 所述的扩增引物 Lv-F 和 Lv-R 对待测凡纳滨对虾基因组
DNA 进行 PCR 扩增；

15 c、对扩增产物进行测序，确定权利要求 1 所述的 SNP 标记的基因型，选择
TT 基因型的个体作为后备亲本进行耐低盐凡纳滨对虾品种育种。

5、根据权利要求 4 所述的选育方法，其特征在于，所述的 PCR 扩增，其反
应体系为 25 μ L，包括：不含 Mg^{2+} 的 10 \times PCR buffer 2.5 μ L、25 mM $MgCl_2$ 2.0 μ L，
10 mM dNTP 0.5 μ L、5 U/ μ L PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 0.2 μ L、10 μ M 正
20 向引物 0.5 μ L、10 μ M 反向引物 0.5 μ L、DNA 模板 12.5 ng，其余由无菌水补足
至 25 μ L。

6、根据权利要求 4 或 5 所述的选育方法，其特征在于，所述的 PCR 扩增，
其反应程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟；95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸
1 分钟，共 35 个循环；72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 分钟。

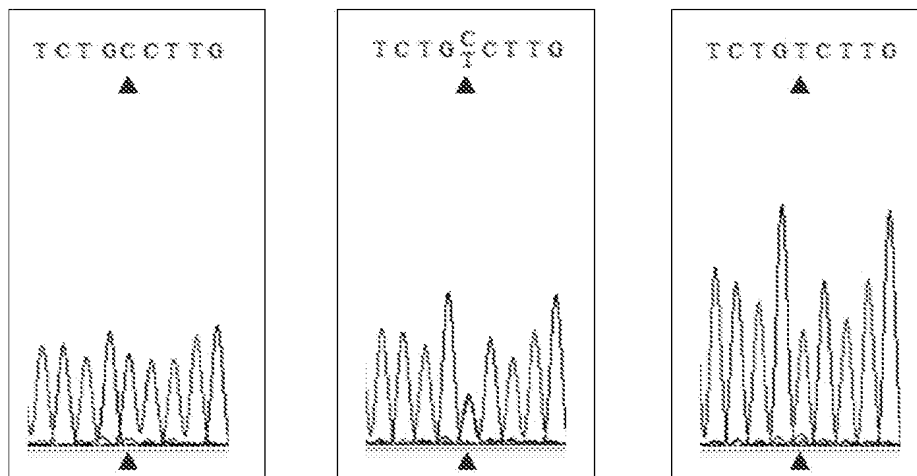


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/088329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2018.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i; C12N 15/55 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNMED; USTXT; CPRSABS; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; JPTXT; CNMED; USTXT; CPRSABS; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; JPTXT; DWPI; SIPOABS: 凡纳滨对虾, 凡纳对虾, 南美白对虾, 低盐, 盐度, 耐受, 耐低盐, 分子标记, 基因, 检测, ATP 酶, Litopenaeus vannamei, shrimp, salt, salinity, sodium, low-salinity, hypohaline, low-salt, resistance, resist+, marker, gene, genetic, SNP, Na-K ATPase, detect+, search based on SEQ ID NO: 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105969873 A (SOUTH CHINA SEA INSTITUTE OF OCEANOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCE), 28 September 2016 (28.09.2016), see entire document	1-6
A	张立田等, “K ⁺ 及主要离子间交互作用对凡纳滨对虾存活, 生长及体内 ATP 酶的影响”, 广东农业科学, 39(6), 30 June 2012 (30.06.2012), pages 116-120, see entire document, (ZHANG, Litian et al., “Effect of K ⁺ and the Interaction of Major Ions on Survival, Growth and ATP Enzymes Specific Activity of Litopenaeus Vannamei”, Guangdong Agricultural Sciences)	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">09 February 2018</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">27 February 2018</p>
<p>Name and mailing address of the ISA</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China</p> <p>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao</p> <p>Haidian District, Beijing 100088, China</p> <p>Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">LI, Kangqi</p> <p>Telephone No. (86-10) 62411034</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/088329

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/088329

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105969873 A	28 September 2016	WO 2017215055 A1	21 December 2017

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNMED; USTXT; CPRSABS; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; JPTXT; CNMED; USTXT; CPRSABS; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; JPTXT; DWPI; SIPOABS: 凡纳滨对虾, 凡纳对虾, 南美白对虾, 低盐, 盐度, 耐受, 耐低盐, 分子标记, 基因, 检测, ATP酶, Litopenaeus vannamei, shrimp, salt, salinity, sodium, low-salinity, hypohaline, low-salt, resistance, resist+, marker, gene, genetic, SNP, Na-K ATPase, detect+, 基于序列SEQ ID NO: 1-2的检索</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 105969873 A (中国科学院南海海洋研究所) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 参见全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>张立田等. "K⁺及主要离子间交互作用对凡纳滨对虾存活、生长及体内ATP酶的影响" 广东农业科学, 第39卷, 第6期, 2012年 6月 30日 (2012 - 06 - 30), 第116-120页 参见全文</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 105969873 A (中国科学院南海海洋研究所) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 参见全文	1-6	A	张立田等. "K ⁺ 及主要离子间交互作用对凡纳滨对虾存活、生长及体内ATP酶的影响" 广东农业科学, 第39卷, 第6期, 2012年 6月 30日 (2012 - 06 - 30), 第116-120页 参见全文	1-6
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
A	CN 105969873 A (中国科学院南海海洋研究所) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 参见全文	1-6									
A	张立田等. "K ⁺ 及主要离子间交互作用对凡纳滨对虾存活、生长及体内ATP酶的影响" 广东农业科学, 第39卷, 第6期, 2012年 6月 30日 (2012 - 06 - 30), 第116-120页 参见全文	1-6									
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。									
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2018年 2月 9日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 2月 27日</p>										
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>李康琦</p> <p>电话号码 (86-10)62411034</p>										

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- 纸件形式
- 电子形式
- b. (提交时间)
- 含在申请提交时的国际申请中
- 以电子形式与国际申请一起提交
- 为检索之用随后提交本单位
2. 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/088329

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 105969873 A	2016年 9月 28日	WO 2017215055 A1	2017年 12月 21日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)