



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105331570 B

(45)授权公告日 2019.04.02

(21)申请号 201510864412.4

A23K 10/22(2016.01)

(22)申请日 2015.11.30

A01K 97/04(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105331570 A

(43)申请公布日 2016.02.17

(73)专利权人 中国科学院水生生物研究所

地址 430072 湖北省武汉市武昌区东湖南路7号

(72)发明人 李涛 李顺 张桂英 林非比

赵进东

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 龚莹莹 王敏锋

(51)Int.Cl.

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

A23K 50/80(2016.01)

A23K 10/18(2016.01)

(56)对比文件

CN 1974775 A,2007.06.06,

CN 101054584 A,2007.10.17,

JP 2014-14355 A,2014.01.30,

吴初新等.重组干扰素、趋化因子合剂对草鱼免疫保护作用.《南昌大学学报(理科版)》.2014,第38卷(第1期),第91-95页.

Dongming Li 等.Immunoprotection of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) with recombinant interferon (rCiIFN) against GCHV infection.《Aquaculture》.2013,第42-48页.

审查员 吴颖

权利要求书2页 说明书9页

序列表1页

(54)发明名称

一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌及应用

(57)摘要

本发明公开了一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌及应用,通过将鲫鱼IFN基因转入蓝藻,获了一种可表达鲫鱼干扰素的转基因蓝藻。将该转基因蓝藻作为饲料添加剂加入鱼饲料中,减少了干扰素在投喂过程中以及消化道中的损耗,实现了使用投喂的方式即能达到提高免疫保护效果的目的,同时这种方法比注射免疫更为便利,适用于鱼类养殖业。因此,将转基因蓝藻作为饲料添加剂添加到鱼饲料中,通过其中的干扰素来提高动物体的免疫机能,从而提高其抗病能力,为开发安全的免疫增强型饲料提供一种解决方案。

1. 一种含有转基因蓝藻的鱼饲料,包括:

| 组分 | 重量份 |
|--------------|---------|
| 鱼粉 | 40-50 |
| 虾粉 | 3-8 |
| 转基因蓝藻 | 1-4 |
| α -淀粉 | 7-15 |
| 玉米淀粉 | 15-20 |
| 鱼油 | 0.5-3 |
| 大豆油 | 0.5-3 |
| 维生素预混料 | 0.1-0.5 |
| 胆碱 | 0.1-0.5 |
| 矿物盐预混料 | 1-2 |
| 二水磷酸二氢钠 | 1-2 |
| 磷酸二氢钾 | 1-3 |
| 二水磷酸氢钙 | 0.5-1.5 |
| 纤维素 | 5-10 |
| 羧甲基纤维素 | 1-5 |
| 海藻酸钠 | 1-5; |

所述的转基因蓝藻包含质粒CaIFN-pAEQ19,该质粒为将SEQ ID NO.1所示多核苷酸连接进质粒pAEQ19后得到。

2. 权利要求1所述的鱼饲料在制备提高鱼抗病毒能力药物中的应用。

3. 根据权利要求1所述的鱼饲料,包括:

| 组分 | 重量份 |
|--------------|-------|
| 鱼粉 | 45.00 |
| 虾粉 | 5.00 |
| 转基因蓝藻 | 2.00 |
| α -淀粉 | 10.00 |
| 玉米淀粉 | 17.00 |
| 鱼油 | 1.00 |
| 大豆油 | 1.00 |
| 维生素预混料 | 0.39 |
| 胆碱 | 0.11 |
| 矿物盐预混料 | 1.38 |
| 二水磷酸二氢钠 | 1.25 |
| 磷酸二氢钾 | 1.60 |
| 二水磷酸氢钙 | 0.77 |
| 纤维素 | 7.50 |
| 羧甲基纤维素 | 3.00 |
| 海藻酸钠 | 3.00; |

所述的维生素预混料,按1kg计,包括:维生素A 0.469g,维生素D 0.128g,维生素E 2.564g,维生素K 2.564g,烟酸 25.641g,核黄素 5.128g,吡哆醇 5.128g,硫胺 5.128g,泛酸钙12.821g,生物素 0.026g,叶酸 1.282g,维生素B12 5.128g,抗坏血酸 25.641g,肌醇 25.641g,麦麸粉 882.711g;

所述的矿物盐预混料,按1 kg计,包括:氯化钠 36.232g,硫酸镁 543.478g,硫酸铁 90.580g,乳酸钙 126.812g,硫酸锌 12.790g,硫酸锰 5.870g,硫酸铜 1.123g,硫酸钴 0.036g,碘化钾 0.109g,淀粉 16.304g,沸石粉 166.666g。

4. 权利要求1所述的鱼饲料,所述的转基因蓝藻的制备方法,包括:

- 1) 将SEQ ID NO.1所示目的基因与T载体连接转化大肠菌,得到阳性重组质粒CaIFN-T;
- 2) 采用双酶切的方法,将目的基因从质粒CaIFN-T上切下与含有同样酶切位点的质粒pAEQ19连接,得到重组质粒CaIFN-pAEQ19;
- 3) 利用常规方式将CaIFN-pAEQ19转入蓝藻*Synechococcus* sp.PCC7002中,经PCR检测,获得转基因蓝藻。

一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌及应用

技术领域

[0001] 发明属于生物技术领域,具体涉及一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌及应用。

背景技术

[0002] 随着水产养殖业的快速发展,养殖期间病害亦越来越严重。大量、盲目使用抗生素和化学合成药物不但防治效果差,而且还造成一系列不良后果。因此,国内外一些学者从免疫学角度开展水产养殖病害防治研究,通过给水产动物服用免疫添加剂来提高动物体的特异性和非特异性免疫机能,从而提高其抗病能力(朱小明,2005)。干扰素系统是机体对抗病毒感染的一道重要防御系统,它与细胞免疫、体液免疫及其他非特异性免疫协同作用抵抗病毒的侵染。在干扰素系统中产生的干扰素是一种广谱抗病毒剂,其作用是通过与细胞表面受体作用使细胞产生抗病毒蛋白,抑制病毒在宿主细胞中的复制。还可增强自然杀伤细胞、巨噬细胞和T淋巴细胞的活力,从而起到免疫调节作用,增强抗病毒能力,在一定程度上还影响细胞生长和分化等多种生物活性。鱼类干扰素同样具有广谱的抗病毒功能,研究表明其能够诱导大量抗病毒基因的表达,包括其本身,形成一个正反馈作用,从而保护机体避免病毒感染致死。

[0003] 重组干扰素作为一种蛋白质多肽类药物成功应用于人类和一些动物病毒病的防治。鱼类养殖业使用重组干扰素防治疾病发生的方法思路有三种,即注射、浸浴和口服。这些方法的初步应用研究表明所用防治方法不同,疗效差异较大:仅注射免疫方式使鱼获得一定的免疫保护,而拌料投喂(口服)和浸浴两种免疫方式未显示出免疫保护效果。然而,在养殖实践中注射免疫过于耗时耗力,如何减少重组干扰素在消化道吸收过程中的损耗,使更为便利和实用的投喂方式也同样发挥作用?这是对于养殖鱼类病毒病防治具有实用价值的问题。

[0004] 蓝藻,作为高档水产养殖动物的饲料或饲料添加剂早已被广泛应用。蓝藻 *Synechococcus* sp.PCC 7002作为一种能够光合自养的微生物,其低廉的培养成本,高效的生长速率以及特殊的细胞结构,为其作为产生干扰素CaIFN的工程菌提供了很大潜力。此外蓝藻 *Synechococcus* sp.PCC 7002的全基因组测序与功能注释已经完成,分子和遗传学操作十分方便;使得在蓝藻 *Synechococcus* sp.PCC 7002中表达外源的干扰素CaIFN基因成为可能。本发明使用转基因蓝藻作为饲料添加剂加入鱼饲料中,减少了干扰素在投喂过程中以及消化道中的损耗,实现了使用投喂的方式即能达到提高免疫保护效果的目的,同时这种方法比注射免疫更为便利,适用于鱼类养殖业。因此,将转基因蓝藻作为饲料添加剂添加到鱼饲料中,通过其中的干扰素来提高动物体的免疫机能,从而提高其抗病能力,为开发安全的免疫增强型饲料提供一种解决方案。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌,通过转基因技术将鲫鱼IFN(CaIFN)基因克隆至蓝藻中,即可得到一种分泌干扰素的蓝藻工程菌。

[0006] 本发明的另一个目的在于提供含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌的应用。该基因工程菌可作为鱼饲料的添加剂,通过其中的干扰素来提高动物体的免疫机能,从而提高其抗病能力。

[0007] 本发明还有一个目的在于提供了一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌的鱼饲料,饲料配方合理,该种饲料配方含有鱼类生长所需的各类营养及元素,满足鱼类的生长所需,同时加入了含有干扰素CaIFN的蓝藻,这些原料充分混匀后经饲料机做成大小合适的饲料颗粒,方便投喂,减小干扰素在投喂过程中的消耗,也保护干扰素有效进入鱼体发挥免疫保护效果。

[0008] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术措施:

[0009] 含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌,为将SEQ ID NO.1所示基因通过转基因的方法转入蓝藻中得到。

[0010] 优选的,通过以下步骤获得:

[0011] 1、从鲫鱼中扩增目的基因CaIFN(SEQ ID NO.1所示),将目的基因与T载体连接转化大肠菌,得到阳性重组质粒CaIFN-T。

[0012] 2、采用双酶切的方法,将目的基因从质粒CaIFN-T上切下与含有同样酶切位点的质粒pAEQ19(Dongyi Xu 2005;Plant Physiology,July 2005,Vol.138,pp.1586-1595)连接,得到重组质粒质粒CaIFN-pAEQ19。

[0013] 3、利用常规方式将CaIFN-pAEQ19转入蓝藻*Synechococcus* sp.PCC 7002中,经PCR检测,获得转基因蓝藻。

[0014] 含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌的应用,包括利用该转基因蓝藻用于鱼饲料的添加剂。将含有干扰素CaIFN的蓝藻工程菌冷冻干燥后制成转基因蓝藻藻粉,按1%~3%的剂量添加进鱼饲料中。

[0015] 一种含有干扰素CaIFN的蓝藻工程菌的鱼饲料,包括:

| 组分 | 重量份 |
|--------------|-------|
| 鱼粉 | 40-50 |
| 虾粉 | 3-8 |
| 蓝藻 | 1-4 |
| α -淀粉 | 7-15 |

| | | |
|--------|---------|---------|
| | 玉米淀粉 | 15-20 |
| | 鱼油 | 0.5-3 |
| | 大豆油 | 0.5-3 |
| | 维生素预混料 | 0.1-0.5 |
| | 胆碱 | 0.1-0.5 |
| [0017] | 矿物盐预混料 | 1-2 |
| | 二水磷酸二氢钠 | 1-2 |
| | 磷酸二氢钾 | 1-3 |
| | 二水磷酸氢钙 | 0.5-1.5 |
| | 纤维素 | 5-10 |
| | 羧甲基纤维素 | 1-5 |
| | 海藻酸钠 | 1-5 |

[0018] 所述的蓝藻为一种分泌干扰素CaIFN的转基因,通过将CaIFN基因克隆至蓝藻中获得。一种含有干扰素CaIFN的蓝藻工程菌的鱼饲料,包括以下配方(最佳配比):

| | | |
|--------|--------------|-------|
| | 组分 | 重量份 |
| | 鱼粉 | 45.00 |
| | 虾粉 | 5.00 |
| | 蓝藻 | 2.00 |
| | α -淀粉 | 10.00 |
| | 玉米淀粉 | 17.00 |
| | 鱼油 | 1.00 |
| | 大豆油 | 1.00 |
| [0019] | 维生素预混料 | 0.39 |
| | 胆碱 | 0.11 |
| | 矿物盐预混料 | 1.38 |
| | 二水磷酸二氢钠 | 1.25 |
| | 磷酸二氢钾 | 1.60 |
| | 二水磷酸氢钙 | 0.77 |
| | 纤维素 | 7.50 |
| | 羧甲基纤维素 | 3.00 |

[0020] 海藻酸钠 3.00；

[0021] 优选的,所述的维生素预混料,按1kg计,包括:维生素A 0.469g,维生素D 0.128g,维生素E 2.564g,维生素K 2.564g,烟酸25.641g,核黄素5.128g,吡哆醇5.128g,硫胺5.128g,泛酸钙12.821g,生物素0.026g,叶酸1.282g,维生素B12 5.128g,抗坏血酸25.641g,肌醇25.641g,麦麸粉882.711g;

[0022] 所述的矿物质预混料,按1kg计,包括:氯化钠36.232g,硫酸镁543.478g,硫酸铁90.580g,乳酸钙126.812g,硫酸锌12.790g,硫酸锰5.870g,硫酸铜1.123g,硫酸钴0.036g,碘化钾0.109g,淀粉16.304g,沸石粉166.666g。

[0023] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0024] 1、蓝藻*Synechococcus* sp.PCC 7002是天然的感受态,一般不经过任何处理,即可直接用于转化外源DNA。方便进行基因改造,使其成为生产干扰素CaIFN的工程菌。此外其低廉的培养成本,高效的生长速率使得生产成本大为下降。

[0025] 2、蓝藻富含蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸和细胞色素等多种重要的生命活性物质,作为高档水产养殖动物的饲料或饲料添加剂早已被广泛应用,是一种天然理想的无公害饲料添加剂。该种饲料配方含有转基因蓝藻,及鱼类生长所需的各类营养及元素,满足鱼类的生长所需,利用含有干扰素的蓝藻作为饲料添加剂,减少了干扰素在投喂过程中以及消化道中的损耗,实现了使用投喂的方式即能达到提高免疫保护效果的目的,同时这种方法比注射免疫更为便利,适用于鱼类养殖业。因而通过改造蓝藻作为干扰素添加剂的载体,不仅能使其高效表达干扰素CaIFN来提高动物体的免疫机能,增强抗病能力,有效的减少抗生素和化学合成药物的使用,蓝藻本身也富含蛋白质、多糖、不饱和脂肪酸和细胞色素等多种重要的生命活性物质,是一种理想的鱼类饵料,这两者的结合有助于提高水产产品的品质和产量。

[0026] 3.现有技术表明很多投喂方式添加干扰素不能显示出免疫作用,只有注射能够达到干扰素的效果,本发明首次发现,通过蓝藻作为载体对干扰素进行表达,实现了投喂也可有效的目的。

具体实施方式

[0027] 本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规方案,所述试剂如未特别说明,均购自商业渠道。

[0028] 实施例1:

[0029] 转基因CaIFN蓝藻的获得

[0030] 对野生型鲫鱼取肝脏,于液氮中速冻碾磨成粉末状。加入1ml Trizol充分混匀,提取总RNA,反转录成cDNA库,对ifn的ORF区域设计带酶切位点NdeI和BamHI的引物Algae-CaIFN-F:ATCGCATATGATGAAAACCTCAAATGTGG,Algae-CaIFN-R2:ATCGGATCCTTATCGTCTGTTGGCAAT进行PCR扩增。核酸凝胶电泳后通过胶回收得到DNA片段,与载体pAEQ19分别进行酶切,进行凝胶电泳再次回收DNA片段,16℃连接3小时,转化至大肠杆菌DH5α,挑取阳性克隆。转接至新鲜培养基,提取质粒。同时通过测序验证序列正确。

[0031] 引物序列如下:

[0032] Algae-CaIFN-F ATCGCATATGATGAAAACCTCAAATGTGG

[0033] Algae-CaIFN-R2 ATCGGGATCCTTATCGTCTGTTGGCAAT

[0034] 取培养的600ul聚球藻PC7002 (OD550nm值为0.19), 6000r/min离心2min, 弃400ul上清液, 加入制备好的质粒10ul, 轻轻混匀, 遮光静置4-8小时。将藻液均匀涂在A+固体培养基上, 静置12-14小时, 倒Top agar (5ml Top agar包含链霉素35ul (10mg/ml))。静置培养15天左右。

[0035] 从A+固体培养基上挑选出单菌落, 继续在已加入链霉素抗性的A+固体培养基上培养, 划线分离重复三代, 从最后一次的培养基上挑选单菌落进行扩大培养。

[0036] 检测转化的聚球藻PCC7002。采用PCR方法检测 (邢州等, 2009)。吸取野生型和转化型的聚球藻PCC7002的藻液150ul, 6000r/min离心1min, 吸弃上清液, 加入50ul无菌水和20ul玻璃珠, 使用Vortex振荡1min, 吸取上清液, 并以此为模板, 引物Algae-CaIFN-F/Algae-CaIFN-R2扩增目的基因约0.5kb长短的片段, 产物进行电泳检测, 获得转入外源基因CaIFN的转基因蓝藻。

[0037] 野生型聚球藻7002使用的培养基是A+培养基, 转基因蓝藻使用的培养基是A+培养基中添加抗生素链霉素, 添加浓度为100μg/mL。野生型聚球藻7002和转基因蓝藻在平板上生长时使用的是固体培养基, 其他时候使用的是液体培养基。

[0038] A+液体培养基如下:

[0039]

| 试剂 | 终浓度 |
|---|-------|
| 硝酸钠 (NaNO ₃) | 1g/L |
| 氯化钠 (NaCl) | 18g/L |
| 七水硫酸镁 (MgSO ₄ · 7H ₂ O) | 5g/L |
| Tris盐酸 (Tris · HCl (pH8.2)) | 1g/L |

[0040]

| | |
|--|----------|
| 氯化钾 (KCl) | 600mg/L |
| *氯化钙 (CaCl ₂) | 270mg/L |
| *磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄) | 50mg/L |
| 乙二胺四乙酸 (EDTA) | 30mg/L |
| *碳酸钠 (Na ₂ CO ₃) | 20mg/L |
| 六水合三氯化铁 (FeCl ₃ · 6H ₂ O) | 3.89mg/L |
| Trace metal elements (A ₅) | 1ml/L |
| 硼酸 (H ₃ BO ₃) | 2.86mg/L |
| 氯化锰 (MnCl ₂ · 4H ₂ O) | 1.81mg/L |
| 硫酸锌 (ZnSO ₄ · 7H ₂ O) | 0.22mg/L |
| 锰酸钠 (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O) | 0.39mg/L |
| 五水硫酸铜 (CuSO ₄ · 5H ₂ O) | 0.1mg/L |
| 硝酸钴 (Co (NO ₃) ₂ · 6H ₂ O) | 0.05mg/L |
| *维生素B12 (Vitamin B12) | 4μg/L |

[0041] 补充说明: 标“*”的为事先单独灭菌然后在超净台加的组分。固体培养基配方为在上述的液体培养基中添加1.5%的琼脂粉。

- [0042] 转基因蓝藻CaIFN基因的表达活性的验证：
- [0043] 总蛋白提取
- [0044] 1.在蓝藻Synechococcus sp.PCC 7002最优生长条件下(38℃,1% (v/v) CO₂/空气,~250μE m⁻²s⁻¹)培养转基因蓝藻60ml,培养至OD730nm约1左右,收集藻细胞；
- [0045] 2.弃上清,用1ml PBS重悬藻细胞,4℃,8000rpm,10min收集藻细胞。再加入PBS漂洗液,重复一次；
- [0046] 3.用500ul裂解液重悬藻细胞(RIPA,1:100100X PMSF以及100X蛋白酶抑制剂),超声破碎细胞,2s,2s,30min；
- [0047] 4.12000rpm,4℃,10min,取上清；
- [0048] 5.5倍体积的丙酮-20℃沉淀过夜；
- [0049] 6.用BCA法定量蛋白浓度。
- [0050] 7.定量后的蛋白用于SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结果显示,基因CaIFN在预期的地方有条带。
- [0051] 8.将目的条带切下,酶解蛋白,使用离子阱液质联用仪测定目的肽段,结果显示,切下的位置是目的蛋白的肽段,证明此蛋白在转基因蓝藻中能有效的表达。

| | 肽段 | P值 | e值 | |
|--------|----------------------|------------------|---------------|---|
| [0052] | RLYNMIDNAKV | < 0.05 | 0.0097 | CaIFN MKTQMWTYMFVMFLTLQGQCSACEWLG RYRMISNESLSLLKEMGGKYPEGTKVSFP GRLYNMIDNAKVEDQVKFLVLTLDHIIRLM DAREHMNSVQWNLQTVHEFLTVLNRQSS DLKECVARYQPSHKESYEKKINRHFKILK KNLKKKEYSAQAWEQIRRAVKHHLQRM DIIASIANRR |
| | KFLVLTLDHIIRL | < 0.05 | 2e-005 | |

- [0053] 实施例2：
- [0054] 转基因蓝藻作为饲料添加剂的应用,其应用过程是：
- [0055] 制备添加转基因蓝藻饲料
- [0056] 1、在蓝藻Synechococcus sp.PCC 7002最优生长条件下(38℃,1% (v/v) CO₂/空气,~250μE m⁻²s⁻¹)大量养殖转基因蓝藻,收获后离心,冷冻干燥,制得冻干藻粉。
- [0057] 2、饲料配方包括：
- [0058] 表1
- [0059]

| | 重量份 | 粗蛋白 (CP) | 粗脂肪 (CL) | 总能 (E) |
|------|-------|----------|----------|--------|
| 鱼粉 | 45.00 | 30.24 | 3.84 | 8.64 |
| 虾粉 | 5.00 | 3.29 | 0.90 | 1.15 |
| 蓝藻 | 2.00 | 1.26 | 0.12 | 0.35 |
| α-淀粉 | 10.00 | 0.16 | 0.00 | 1.65 |
| 玉米淀粉 | 17.00 | 0.28 | 0.00 | 2.81 |
| 鱼油 | 1.00 | 0.00 | 1.00 | 0.39 |
| 大豆油 | 1.00 | 0.00 | 1.00 | 0.39 |

| | | | | |
|--------|------|------|------|------|
| 维生素预混料 | 0.39 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 胆碱 | 0.11 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 矿物盐预混料 | 1.38 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

[0060]

| | | | | |
|---------|--------|-------|------|-------|
| 二水磷酸二氢钠 | 1.25 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 磷酸二氢钾 | 1.60 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 二水磷酸氢钙 | 0.77 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 纤维素 | 7.50 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 羧甲基纤维素 | 3.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 海藻酸钠 | 3.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Total | 100.00 | 35.24 | 6.86 | 15.39 |

[0061] 鱼粉为白鱼粉;虾粉为饲料级虾粉;鱼油为混合鱼油;大豆油为食用大豆油;均购于武汉高龙饲料有限公司。

[0062] 维生素和矿物盐预混料由广州海因特生物技术有限公司提供。

[0063] 所述的维生素预混料,按1kg计,包括:维生素A 0.469g,维生素D 0.128g,维生素E 2.564g,维生素K 2.564g,烟酸25.641g,核黄素5.128g,吡哆醇5.128g,硫胺5.128g,泛酸钙12.821g,生物素0.026g,叶酸1.282g,维生素B12 5.128g,抗坏血酸25.641g,肌醇25.641g,麦麸粉882.711g;

[0064] 所述的矿物质预混料,按1kg计,包括:氯化钠36.232g,硫酸镁543.478g,硫酸铁90.580g,乳酸钙126.812g,硫酸锌12.790g,硫酸锰5.870g,硫酸铜1.123g,硫酸钴0.036g,碘化钾0.109g,淀粉16.304g,沸石粉166.666g。

[0065] 从中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼研究中心购得野生型的斑马鱼,按照斑马鱼的正常生活条(28℃,通气)件驯养两周,驯养期间饲喂从斑马鱼中心购买的斑马鱼饲料。

[0066] 两周后,实验组投喂添加转基因蓝藻饲料,对照组投喂添加非转基因蓝藻的饲料,每隔一天取一次样,每次取样取三尾鱼,取其头肾,连续饲养一个月,取样12次。取的样品放在TRIzol试剂中,放-80℃冷藏,用于后续的实验。

[0067] qRT-PCR检测

[0068] Real-time PCR的每一个反应体系为20μl,反应混合物的各组成成分为:

LightCycler® 480 SYBR Green I Master; 2× conc. 10μl

Forward primer(10μM) 0.5μl

[0069] Reverse primer(10μM) 0.5μl

cDNA 模板 1μl

加 RNase-free 水至 20μl

[0070] PCR反应条件如下:95℃(4.40℃/s),5min,然后95℃(4.40℃/s),20s,55℃(2.20℃/s),20s,72℃(4.40℃/s)20s,45个循环。融解曲线分析过程,95℃(4.40℃/s),5s,65℃(2.20℃/s),1min,97℃(0.11℃/s)每5℃采集一次荧光信号,1个循环,最后40℃(2.20℃/s),30s.qRT-PCR的引物:ifn1F:CTGAAGGAAATGGGTGG,ifn1R:CTTATGTGATGGCTGGTAT;β-

actinF:GTTGCCATCCAGGCTGTGCT,β-actinR:AGGTCACGGCCAGCCAAGTC

[0071] 将内参和目的基因分两管同时扩增,设3个生物学平行重复。不同样品的内参基因rRNA和目的基因片段分别进行实时荧光PCR检测,测定Ct值。采用Roche公司自带的软件中相对定量解析的比较Ct法处理实验结果。采用Roche公司LightCycler® 480自带的LightCycler480Software 1.5进行样品间相对表达量的分析。通过样品中所含ifn1的量为参考标准,将各数据均一化处理后比较样品中目的基因mRNA的相对含量。

[0072] 在每次实验中,融解曲线的分析同时进行,以确定产物没有非特异性扩增,并且没有引物二聚体,不会影响数据的可靠性。

[0073] qRT-PCR检测实验鱼在投喂添加转基因蓝藻和非转基因蓝藻饲料条件下头肾中ifn1基因的表达,WT代表饲喂添加非转基因蓝藻饲养的鱼,CA代表添加转基因蓝藻饲养的鱼。采用Roche公司LightCycler® 480自带的LightCycler480 Software 1.5进行样品间相对表达量的分析。mRNA的相对表达量采用如下公式:

$$[0074] \quad \text{结果} = \frac{\frac{\text{目标基因浓度 (样本)}}{\text{参比基因浓度}}}{\frac{\text{目标基因浓度 (样本对照)}}{\text{参比基因浓度}}}$$

[0075] 其中样品中所含β-actin的量为参考标准,饲喂添加非转基因蓝藻饲养的鱼为样本对照。检测的目的基因及结果如下:

[0076]

| 日期 | 样品名称 | 基因名称 | 标准化比值 |
|-----------|---------|------|-------------|
| 2014/7/4 | WT-TS-1 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/4 | CA-TS-1 | ifn1 | 1.315894266 |
| 2014/7/7 | WT-TS-2 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/7 | CA-TS-2 | ifn1 | 1.583775814 |
| 2014/7/10 | WT-TS-3 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/10 | CA-TS-3 | ifn1 | 1.168593288 |
| 2014/7/13 | WT-TS-4 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/13 | CA-TS-4 | ifn1 | 2.170883397 |
| 2014/7/17 | WT-TS-5 | ifn1 | 1 |

[0077]

| | | | |
|-----------|---------|------|-------------|
| 2014/7/17 | CA-TS-5 | ifn1 | 3.18338505 |
| 2014/7/19 | WT-TS-6 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/19 | CA-TS-6 | ifn1 | 0.274061203 |
| 2014/7/23 | WT-TS-7 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/23 | CA-TS-7 | ifn1 | 0.946953362 |
| 2014/7/25 | WT-TS-8 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/25 | CA-TS-8 | ifn1 | 0.414094813 |
| 2014/7/29 | WT-TS-9 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/29 | CA-TS-9 | ifn1 | 1.716982882 |

| | | | |
|-----------|----------|------|-------------|
| 2014/7/31 | WT-TS-10 | ifn1 | 1 |
| 2014/7/31 | CA-TS-10 | ifn1 | 0.326767373 |
| 2014/8/4 | WT-TS-11 | ifn1 | 1 |
| 2014/8/4 | CA-TS-11 | ifn1 | 1.619949357 |
| 2014/8/7 | WT-TS-12 | ifn1 | 1 |
| 2014/8/7 | CA-TS-12 | ifn1 | 0.078571608 |

[0078] 样品名称中WT-TS代表饲喂添加非转基因蓝藻饲养的鱼的头肾样品,CA-TS代表添加转基因蓝藻饲养的鱼的头肾样品。

[0079] 数据可发现检测的基因中,实验组鱼,即饲喂添加转基因蓝藻的鱼,在饲养14天左右,ifn1表达上调。表明饲喂添加转基因蓝藻的鱼体内干扰素表达高于对照组,由于转基因蓝藻中含有干扰素蛋白,通过结合细胞膜表面干扰素受体,激活细胞内信号通路,促进细胞内干扰素的转录表达,形成正反馈作用,同时激活相关抗病毒蛋白的产生,使鱼体抗病毒感染能力得到加强。

[0080] 实施例3:

[0081] 实施例2的饲料配方可显著提高斑马鱼的抗病毒能力:

[0082] 1、野生型实验斑马鱼六月龄(孵化后生长了六个月)26℃驯养两周(George E. Sander s,2003)。

[0083] 2、将驯养好的鱼分为两个实验组,即添加转基因蓝藻饲料和添加非转基因蓝藻饲料(非转基因蓝藻饲料配方为表1所示配方但不添加转基因蓝藻),饲养14天。饲料投放方式是每天10:00,16:00投喂两次,饱食量投喂。每组是35条鱼。

[0084] 3、14天后,每组鱼分为实验组和对照组,实验组鱼注射5u1稀释一百倍的SVCV病毒,稀释前的滴度是 10^{10} ,对照组注射生理盐水,继续饲料,观察死亡情况。

[0085] 4、实验结果如下:

[0086]

| 累积斑马鱼死亡数(条) | Ca饲料喂养 | WT饲料喂养 |
|-------------|--------|--------|
| 注射病毒当日 | - | - |

[0087]

| | | |
|--------|----|----|
| 注射后第一天 | - | - |
| 注射后第二天 | 1 | 4 |
| 注射后第三天 | 9 | 12 |
| 注射后第四天 | 10 | 13 |

[0088] 通过实验结果分析可知,饲养添加转基因蓝藻饲料组从第三天开始死亡数目明显比野生藻组少,并且最终饲养添加转基因蓝藻饲料组斑马鱼存活率比野生藻组高近30%,说明CaIFN对成鱼具有保护作用。

| [0001] | | SEQUENCE LISTING | |
|--------|-------|--|-----|
| [0002] | <110> | 中国科学院水生生物研究所 | |
| [0003] | <120> | 一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌及应用 | |
| [0004] | <130> | 一种含有鲫鱼IFN干扰素的蓝藻工程菌及应用 | |
| [0005] | <160> | 1 | |
| [0006] | <170> | PatentIn version 3.1 | |
| [0007] | <210> | 1 | |
| [0008] | <211> | 543 | |
| [0009] | <212> | DNA | |
| [0010] | <213> | 人工序列 | |
| [0011] | <400> | 1 | |
| [0012] | | atgaaaactc aatgtggac gtatatgttt gtaatgtttt taactctgca gggccaatgc | 60 |
| [0013] | | tctgcttgcg aatggctcgg ccgatacagg atgataagca acgagtcttt gacccctctg | 120 |
| [0014] | | aaggaaatgg gtggaaaata tcttgagggt accaaggtgt catttccagg acgcctgtac | 180 |
| [0015] | | aacatgatag acaatgcca ggtggaggac caggatgaagt ttcttgcct gaccttagat | 240 |
| [0016] | | catatcatcc gcctcatgga tgccagagag cacatgaatt cagtgcagtg gaacctacag | 300 |
| [0017] | | actgtagagc attttctaac tgtcctgaac aggcagtcac ctgatcttaa agaattgtgtg | 360 |
| [0018] | | gcccgatacc agccatcaca taaggagtcc tacgagaaaa agataaacag acaacttcaag | 420 |
| [0019] | | attttaaaga agaattctaa gaaaaaagaa tatagtgtc aagcatggga gcagatccgg | 480 |
| [0020] | | agagctgtga aacatcacct tcagaggatg gacatcatcg caagcattgc caacagacga | 540 |
| [0021] | | taa | 543 |