



转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗半数有效量测定及其对斑马鱼的安全评价

徐 杨¹, 谢京昆¹, 李赞卉¹, 苏永政¹, 何培民^{1,2}, 贾 睿^{1,2*}

(1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水域环境生态上海高校工程研究中心, 上海 201306)

摘要: 为了探究转基因蓝藻作为口服疫苗来防治白斑综合征病毒 (WSSV) 的效果, 本研究将转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗投喂凡纳滨对虾幼苗, 验证其剂量梯度抗 WSSV 的影响, 并测定其半数有效剂量 (ED_{50})。以该剂量为依据投喂斑马鱼, 通过测定斑马鱼体内的酶学指标、观察组织切片及养殖水体中氮磷等的变化, 来探究转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗对水生生物和水体环境造成的影响。研究结果显示, 随着转基因蓝藻口服疫苗剂量的增加, 凡纳滨对虾幼苗抗 WSSV 的能力随之增强, 测得 ED_{50} 为 0.027 g。分别使用野生型和转基因型蓝藻配合饲料投喂斑马鱼 15 d, 投喂结束后其生长状态良好、游动正常; 投喂前后身体颜色无明显差异, 不同组间体长增长不显著。转基因组斑马鱼中过氧化氢酶活力稍低于空白组和野生型组, 过氧化物酶活力随着投喂天数的增长而呈降低趋势; 水质监测发现, 总氮日均波动变化且变化幅度较小, 总磷在投喂期间有所提升, 15 d 时恢复到初始投喂日的水平。投喂蓝藻的 2 组氨氮均要低于空白对照组, 氨氮含量的提升对斑马鱼的抗氧化能力存在一定影响; 组织切片发现, 各组斑马鱼的肝脏、心脏组织细胞无明显差异。研究表明, 转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗可有效增强凡纳滨对虾抗 WSSV 能力, 且抗病能力随着口服疫苗剂量的升高而增强; 投喂斑马鱼后, 斑马鱼无明显的毒理效应, 且对水质影响较小; 转基因 *vp28* 蓝藻作为亚单位疫苗投放对水生生物的影响较小, 可为后续产业规模应用提供基础。

关键词: 转基因蓝藻; 斑马鱼; *vp28*; 半数有效剂量; 安全性

中图分类号: S 942.3

文献标志码: A

白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 自 1992 年首次在亚洲暴发以来^[1], 使得全球虾类养殖业遭受巨大经济损失。WSSV 感染的虾在 3~7 d 内死亡率高达 100%^[2]。WSSV 宿主广泛, 几乎涵盖了对虾、小龙虾、螃蟹等甲壳类动物^[3], 被认为是虾及许多其他甲壳类动物最

致命的病原体。目前, 尚无有效方法可以控制 WSSV^[4]。

基于蛋白质组学分析和蛋白质定位测定, WSSV 已被发现至少含有 59 种结构蛋白^[5], 其中 7 种囊膜蛋白、4 种被膜蛋白和 3 种核衣壳蛋白已被确定^[6], 其中 VP28 和 VP26 占蛋白总量

收稿日期: 2020-02-04 修回日期: 2020-06-19

资助项目: 国家重点研发计划 (2019YFC0312604); 上海市农委科技兴农项目 [沪农科推字 (2017) 第 1-13 号]; 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2014AA093506); 上海市大学生创新训练计划项目 (S201910264057)

第一作者: 徐杨 (照片), 从事分子生物与环境毒理学方面研究, E-mail: stuart0131@qq.com

通信作者: 贾睿, E-mail: rjia@shou.edu.cn



约 60%^[7]。国内外学者研究发现, VP28 作为 WSSV 主要的病毒包膜蛋白之一, 可以与宿主细胞膜上的多种细胞表面分子相互作用^[8-10], 表明 VP28 在 WSSV 进入宿主起着关键作用。蓝藻的转化和基因表达已经比较成熟^[11], 且蓝藻表达的蛋白可以直接投喂幼虾, 相较于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达的蛋白需要进行纯化后才能使用而言, 蓝藻在经济成本和可获取性方面具有较大的优势^[12]。郭媛媛等^[13]通过实验证明, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 幼虾口服转基因 *vp28* 蓝藻疫苗后, 再用 WSSV 感染, 实验组投喂攻毒和浸泡攻毒存活率分别高达 78.80% 和 83.19%, 而阳性对照组 100% 死亡, 证明该转基因蓝藻口服剂的防治效果较好。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是最常用的模式生物之一。斑马鱼凭借个体小、生长周期短、饲养成本低、实验周期短, 且与人类基因组有着 87% 以上的相似性^[14]等特点, 已成为药物开发、环境毒理实验中的研究对象。在环境毒理学中, 其作为模式生物得到越来越广泛的应用, 素有“水中小白鼠”之称, 现已被广泛应用于环境污染物检测与评价^[15]。但目前, 国际上以斑马鱼为模式生物开展转基因药物的生态毒理学研究还比较匮乏^[16]。

本研究中使用转基因 *vp28* 聚球藻 7942 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) 投喂凡纳滨对虾幼虾进行免疫实验, 使用 WSSV 攻毒后确定转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗的半数有效剂量 (median effective dose, ED₅₀), 并以此剂量为依据, 将斑马鱼作为研究对象进行转基因蓝藻口服疫苗的环境释放安全性评价。环境释放实验在前期蓝藻口服疫苗药效实验基础上进行, 验证本口服疫苗的药效和安全性。该研究可为转基因蓝藻对水生生物安全性评价提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

本实验中鱼用麻醉剂间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (三卡因, MS-222) 购自杭州康元化工科技有限公司。总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 试剂盒、过氧化物酶 (POD) 试剂盒、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒购于南京建成生物技术有限公司。4% 多聚甲醛固定液、硫酸卡那霉素、苏木精—伊红 (H.E) 染色剂购于生工生物工程 (上海) 股份

有限公司。

1.2 实验仪器与设备

恒温振荡培养箱 (ZCZY-BGS8, 上海知楚仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (3-18K, 德国 SIGMA 公司); 超低温冰箱 (DW-86L828J 型, Haier 公司); 真空冷冻干燥机 (SCIENTZ-18N, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 紫外分光光度计 (UV-1800 型, 日本岛津公司); 半自动切片机 (RM2145, 德国 Leica 公司); 倒置显微镜 (TS2R-FL, 日本 Nikon 公司)。

1.3 蓝藻的培养

本实验用野生型聚球藻 7942 (一种无毒蓝藻) 来自中国科学院植物研究所, 转基因 *vp28* 聚球藻 7942 (含 Kana 抗性) 由本实验室构建, 使用 BG-11(+N) 培养基^[17], 放置在恒温振荡培养箱中 30 °C、120 r/min 培养, 持续光照 [50 μmol photons/(m²·s)], 2 周后离心 (6 000 r/min, 10 min) 收集藻泥, 冷冻干燥后收集藻粉用于后续实验。

1.4 ED₅₀ 的测定

研究口服不同梯度剂量的转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗对凡纳滨对虾幼苗抗白斑综合征病毒半数有效剂量值。凡纳滨对虾幼虾, 购自厦门市新荣腾水产技术开发有限公司, 选用个体健壮、活力强的幼虾 [体长 (2.0±0.3) cm], 实验前在 21 L 的白色塑料箱中暂养并驯化 7 d, 暂养期间投喂基础饵料。

按照点斜法测定 ED₅₀ 的要求, 分层区组随机化, 将 280 尾虾均分为 5 个剂量组和 2 个对照组 (2 个对照组用普通饵料投喂, 阳性对照组攻毒, 阴性对照组不攻毒), 同时每个组设 2 个平行实验, 每个平行实验 20 尾, 本实验在上海海洋大学藻类实验室进行。根据求出的公比 *r* 设置 5 个投喂梯度, 实验组 1~5 的投喂梯度分别为 0.015、0.021、0.030、0.043 和 0.061 g。不同剂量组用普通饵料补充至 0.061 g, 对照组投喂同等量的普通饵料。实验组每天投喂转基因蓝藻 2 次 (8:00 与 15:00), 对照组每天投喂普通饵料 2 次 (8:00 与 15:00), 晚上均投喂卤虫 (22:00) 0.061 g (表 1)。口服转基因蓝藻 7 d 后, 通过第 3 腹节注射病毒悬浮液进行攻毒实验, 剂量 50 μL/尾^[13], 每天记录各组 10 d 内对虾幼苗的死亡情况。

表 1 转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗半数有效
剂量测定实验分组

Tab. 1 Experimental grouping of ED₅₀ determination of
Synechococcus-expressed *vp28*

组别 groups	每组攻毒 数/尾 no. attacks per group	蓝藻投喂 剂量/g cyanobacteria dosage	投喂时间 feed time
阳性对照 positive	20	—	08:00 蓝藻/饵料 15:00 蓝藻/饵料
阴性对照 negative	20	—	22:00 卤虫 0.061 g (不同剂量组用普通 饵料补充至 0.061 g)
实验组1 group 1	20	0.015	
实验组2 group 2	20	0.021	
实验组3 group 3	20	0.030	
实验组4 group 4	20	0.043	
实验组5 group 5	20	0.061	

根据各实验组对虾的死亡情况计算各组死亡率和存活率, 代入下面公式计算相关数据:

$$ED_{50} = \lg^{-1} \left[X_m - i \left(\sum p - 0.5 \right) \right]$$

式中, X_m 为最高剂量组的对数值, i 为组距, $i = \lg r$, p 为死亡率, r 为各组剂量的公比且位于 1.1~1.6。

1.5 斑马鱼的处理

本实验斑马鱼均为蓝色斑马鱼幼鱼, 购自上海市南汇花鸟市场, 初始体长 1.5~1.9 cm, 暂养 2 周后用于实验。斑马鱼饲养于水循环恒温系统, pH 6.5~7.5, 水温 (28±1) °C, 光照周期 (14L : 10D), 暂养期间每天饲喂干燥脱壳卤虫卵。

1.6 实验处理

随机抽取 5 尾斑马鱼, 用 MS-222 麻醉后, 吸干表面水分, 称重取平均值约为 0.08 g。选取暂养 2 周的具有较强活力的斑马鱼, 按规格进行分组。实验中, 设置空白组、野生型组和转基因组, 每组 15 尾鱼, 每组设置 3 个平行。每日投喂 1 次, 每次投喂量约为鱼体质量的 5%, 空白组仅投喂干燥脱壳卤虫卵 0.06 g/次, 野生型组投喂干燥脱壳卤虫卵和野生干藻粉混合的混合饲料 (0.04+0.02) g/次, 转基因组投喂干燥脱壳卤虫卵和转基因干藻粉混合的混合饲料 (0.04+0.02) g/次。实验共进行 15 d。

1.7 生命体征观察

每天饲喂饲料时, 观察记录斑马鱼生长状

况、死亡率、畸形率及活动是否正常。投喂 15 d 后使用 MS-222 将其麻醉, 观察其表征状况。

1.8 酶活分析

从第 1 天开始, 每隔 1 天从空白组、野生型组及转基因组 3 个组内分别随机抽取 1 尾斑马鱼, 用 MS-222 麻醉后, 吸干表面水分, 称重后置于 10 mL 离心管, 加入鱼体质量 9 倍的生理盐水 (0.9% NaCl), 冰水浴下于匀浆机中匀浆 10 s (5 次), 每次间隔 30 s, 制成 10% 组织匀浆液。将制备好的 10% 组织匀浆于低温离心机 3 000 r/min 离心 10 min, 取 0.2 mL 上清液加入 1.8 mL 生理盐水制成 1% 组织匀浆液。

使用紫外法测定蛋白质浓度, 将 1% 组织匀浆稀释 K 倍, 放置在 10 mm 光径石比色皿中, 使用紫外分光光度计分别测定 280 nm 和 260 nm 2 种波长下的吸光度值 A_{280} 和 A_{260} , 根据公式蛋白质浓度 (mg/mL) = $F \times A_{280} \times K$, 其中 F 为校正因子。

分别使用购自南京建成生物工程研究所的 T-SOD 紫外试剂盒 (A001-1)、POD 紫外试剂盒 (A084-1)、CAT 紫外试剂盒 (A007-2-1) 进行 T-SOD、POD 和 CAT 酶活测定。

1.9 水质分析

从第 1 天开始, 每隔 1 d 从空白组、野生型组和转基因组 3 个组内分别取水样 50 mL, 并加入 0.05 mL 50% 硫酸固定, 置于 4 °C 冰箱冷藏。

根据 GB11893-89^[18], 使用钼酸铵分光光度法测定水样总磷。

根据 HJ 636-2012^[19], 使用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定水样总氮。

根据 HJ 536-2009^[20], 使用水杨酸分光光度法测定水样氨氮。

1.10 组织学分析

取第 15 天喂食 1 h 后的斑马鱼于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 取心脏、肝脏的小块组织转入 70% 乙醇溶液中保存。常规梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 半自动切片机连续切片, 切片厚度约为 5~6 μm, H.E 染色, 通过倒置显微镜观察并拍照记录。

2 结果

2.1 攻毒累计存活率及 ED₅₀

攻毒后凡纳滨对虾幼苗从第 2 天开始出现

死亡，10 d 后计算得到实验组 1~5 的累积死亡率分别为 90%、80%、45%、35% 和 25%(图 1)。

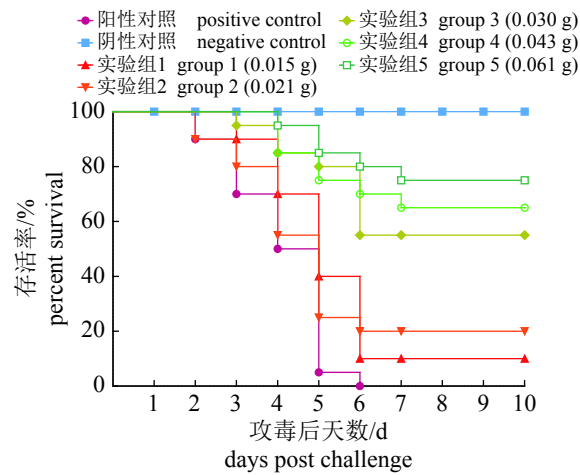


图 1 凡纳滨对虾 10 d 累积存活率

Fig. 1 Cumulative survival of *L. vannamei* for 10 days

阴性对照组在攻毒后的 9 d 之内生长状况良好，没有出现死亡情况，说明本实验排除自然死亡的影响。阳性对照组攻毒后第 6 天累积死亡率达到 100%，说明攻毒对凡纳滨对虾有致死性。实验组 1~5 随着投喂转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗剂量的梯度上升，累积存活率出现明显的上升趋势，表明药效随着剂量的增加而增强，且实验组的死亡时间随着投喂转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗剂量梯度的上升，也出现一定的推迟，说明转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗对凡纳滨对虾抗 WSSV 有一定的免疫作用。通过 ED_{50} 计算公式得到转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗对凡纳滨对虾抗 WSSV 的 ED_{50} 为 0.027 g。

2.2 斑马鱼表观分析

投喂期间，斑马鱼均正常存活，未有任何活动异常的情况出现。斑马鱼在投喂 15 d 后，未出现死亡，其水中游动行为正常。取样后发现 3 组的体色仍保持鲜艳，鱼身并未出现透明、体表鳞片掉落等现象(图 2)。

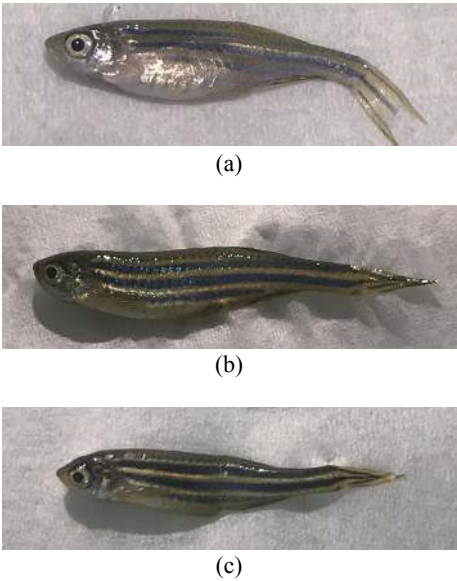


图 2 斑马鱼喂食 15 d 后的表观症状

(a) 空白组, (b) 野生型组, (c) 转基因组

Fig. 2 Apparent symptoms of *D. rerio* after 15 days of feeding in different groups

(a) blank group, (b) wild-type group, (c) transgenic group

每组随机抽取 5 尾投喂前、后的斑马鱼，进行体长及其增长率分析。结果显示，使用蓝藻投喂后斑马鱼的最终体长比空白组有较小增长；对比初始和最终体长发现，投喂藻粉、卤虫粉混合饲料的野生组和转基因组的增长率均要高于空白组，说明投喂混合饲料比仅投喂卤虫干粉对于斑马鱼生长有促进作用(表 2)。

2.3 斑马鱼酶活分析

使用 SPSS 20.0 软件分析不同时间点斑马鱼体内酶的活性，采用 One-Way ANOVA 方法，组间差异都使用最小显著差异法 (least significant difference, LSD)，发现其变化呈现一定的趋势，未添加藻粉时，T-SOD 活性在 5 d 达到最低值，与投喂初期变化极显著 ($P<0.01$)，随后保持上升并稳定波动；投喂野生型蓝藻的 T-SOD 活性自

表 2 斑马鱼不同组别喂食前后的生长情况

Tab. 2 Growth performance of *D. rerio* before and after feeding in different groups

组别 groups	初始体长/cm initial body length	最终体长/cm final body length	增长率/% length gain
空白组 blank group	1.81±0.17	1.98±0.24	9.39±0.65
野生组 wild-type group	1.79±0.20	2.06±0.32	15.41±1.11
转基因组 transgenic group	1.80±0.23	2.07±0.38	14.72±3.00

喂养后开始升高, 在 15 d 达到最高值, 在 9~15 d 活力变化均极显著 ($P<0.01$); 投喂转基因型蓝藻的 T-SOD 活性在 3~11 d 差异较小, 活力变化不显著 ($P>0.05$), 13 d 时达到最高值。上述所有实验的 T-SOD 值在投喂结束时均有升高 (图 3)。

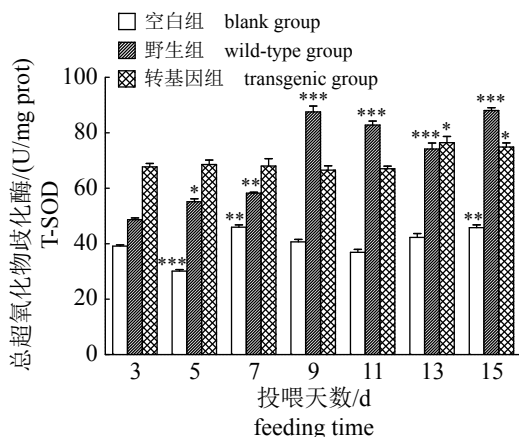


图 3 投喂后斑马鱼的 T-SOD 酶活变化

图中*表示差异具有显著性 ($P<0.05$), **, ***表示差异极显著 ($P<0.01$, $P<0.001$), 下同

Fig. 3 Changes of T-SOD enzyme activity in *D. rerio* after feeding

In the figure, * indicates that the difference is significant ($P<0.05$), and **, *** indicates that the difference is extremely significant ($P<0.01$, $P<0.001$), the same below

未添加藻粉时, 其 POD 活性在 3~9 d 升高, 9 和 13 d 时活性变化极显著 ($P<0.01$), 15 d 时基本恢复初始投喂水平; 投喂野生型蓝藻的 POD 活性在 9 d 时出现最高值, 变化极显著 ($P<0.01$), 在 3~15 d 内整体变化趋势服从正态分布, 投喂结束时的 POD 活性低于初始投喂时期, 差异显著 ($P<0.05$); 投喂转基因型蓝藻的 POD 在 7~9 d 活性变化显著 ($P<0.05$), 整体活性呈降低趋势, 15 d 时达到最低水平 ($P<0.01$) (图 4)。

未添加藻粉时, CAT 活性在 5 d 极显著提高 ($P<0.01$), 7 d 时极其显著提高 ($P<0.001$), 后续活性保持较高水平, 随着投喂天数的增加呈现缓慢波动降低趋势; 投喂野生型蓝藻的 CAT 活性与空白对照组趋势相同, 在 5 d 显著提高 ($P<0.05$), 7 d 时极其显著提高 ($P<0.001$), 且后续活性保持较高水平; 投喂转基因蓝藻的 CAT 活性总体平稳, 5 d 时达到最高水平, 变化显著 ($P<0.05$), 5 d 后呈下降趋势, 11~13 d 活力变化处于最低水平, 变化极显著 ($P<0.01$), 15 d 恢复

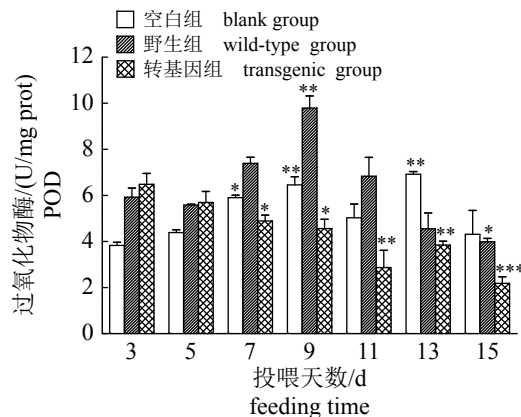


图 4 投喂后斑马鱼的 POD 酶活变化

Fig. 4 Changes of POD enzyme activity in *D. rerio* after feeding

到初始投喂时的水平 (图 5)。

2.4 养殖水体水质分析

通过水质的动态监测, 总氮在养殖期内每组数值日均呈波动趋势, 变化幅度都相对较小。总磷在投喂 3 d 后均出现升高, 因空白组投喂为纯卤虫干粉饲料, 升高幅度较高于藻粉卤虫粉混合组, 随后逐日降低, 转基因组的总磷在 7 d 时达到最高值, 随后逐日降低, 在 15 d 时 3 组的总磷均恢复到初始投喂日的水平 (图 6)。

氨氮是水产养殖系统中普遍存在的有害物质, 主要来自于水体中外源有机物分解以及水生动物自身的内源排泄物。水体中高浓度的氨氮会对鱼类产生氧化应激反应^[21]。空白组和野生型组在 7 d 达到最高水平, 转基因组在 9 d 达到

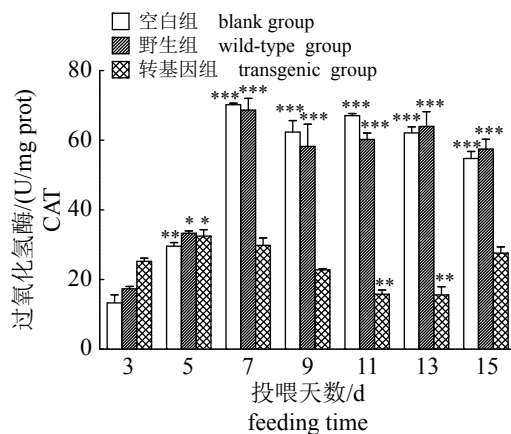


图 5 投喂后斑马鱼的 CAT 酶活变化

Fig. 5 Changes of CAT enzyme activity in *D. rerio* after feeding

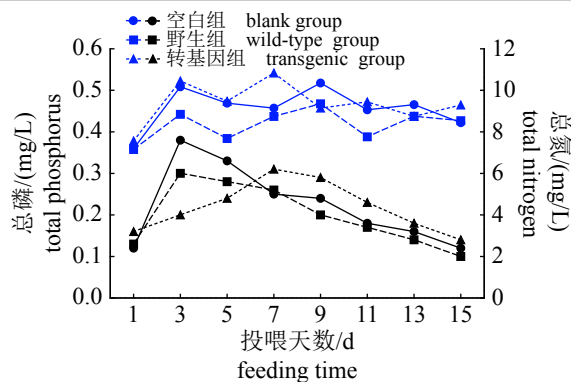


图 6 投喂斑马鱼后在各时间点水体中总氮(蓝)、总磷(黑)的变化

Fig. 6 Changes in total nitrogen (blue) and total phosphorus (black) in water at various time points after feeding *D. rerio*

最高水平, 氨氮含量约 0.5 mg/L, 随后均呈现每日降低的趋势, 15 d 恢复到初始投喂日的水平(图 7)。

2.5 斑马鱼肝脏组织病理学分析

在喂养 15 d 后, 各组斑马鱼肝脏组织病理切片结果显示, 空白对照组的肝脏细胞清晰可见, 细胞排列紧密, 细胞膜结构清晰可见, 细胞核大小正常呈椭圆形, 细胞间隙明显, 未见明显的病理损伤; 野生型组细胞排列紧密, 细胞间隙清晰, 细胞核大小正常, 呈椭圆形, 核仁大小未出现明显异常; 转基因组细胞核清晰可见, 呈椭圆或圆形, 细胞周围出现空隙, 部分出现褶皱, 细胞排列不整齐, 但细胞完好未见破损(图版 I)。

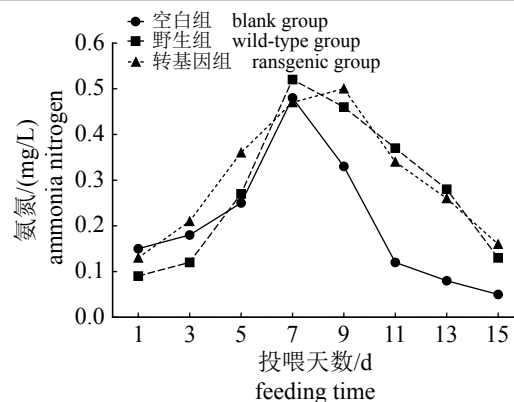


图 7 投喂斑马鱼后在各时间点水体中氨氮的变化

Fig. 7 Changes in ammonia nitrogen in water at various time points after feeding *D. rerio*

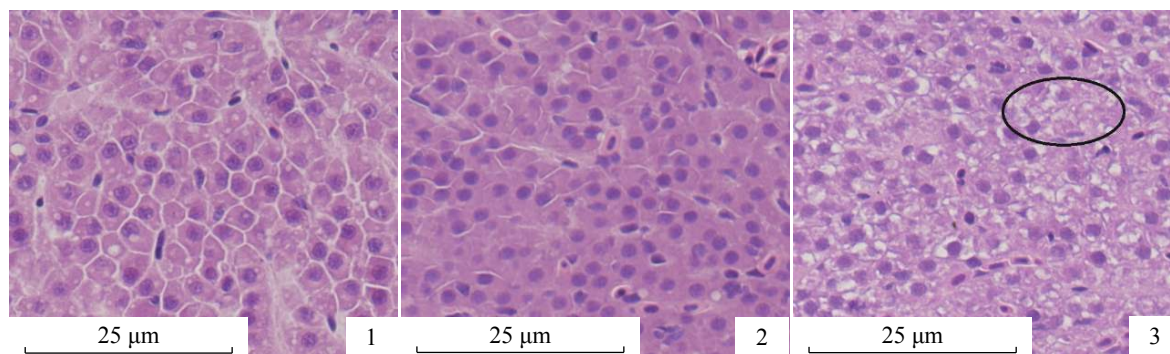
2.6 斑马鱼心脏组织病理学分析

在喂养 15 d 后, 各组斑马鱼心脏组织病理切片结果显示, 3 组的心脏组织细胞均完好且清晰可见, 细胞呈现圆形或梭状, 细胞排列紧密, 细胞膜清晰可见, 细胞大小均匀, 核仁呈明显的深色, 未出现明显细胞空白、褶皱等现象(图版 II)。

3 讨论

水产养殖环境中, 随着抗生素等药剂使用量的增加, 残留抗生素进入水体对水环境的污染日益严重, 对水生物的危害也越来越大。在严格规范控制抗生素的使用后^[22], 转基因疫苗的投用日益广泛。

通过 ED_{50} 计算公式得到转基因 *vp28* 蓝藻口

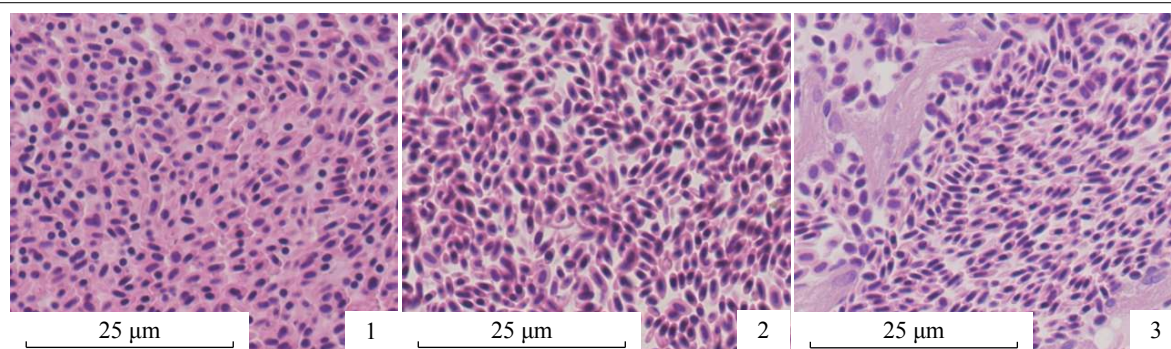


图版 I 投喂 15 d 后各组斑马鱼的肝脏组织切片

1. 空白组, 2. 野生型组, 3. 转基因组; 投喂转基因蓝藻 15 d 后可见肝脏出现细胞褶皱, 实质组织轻微空泡化(图中标注); 下同

Plate I Liver tissue sections of *D. rerio* after 15 days of feeding

1. blank group, 2. wild-type group, 3. transgenic group; slight vacuolation of the liver tissue was observed after feeding transgenic cyanobacteria (marked); the same below



图版 II 投喂 15 d 后各组斑马鱼的心脏组织切片

Plate II Heart tissue sections of *D. rerio* after 15 days of feeding

服疫苗对凡纳滨对虾幼苗抗 WSSV 的 ED_{50} 为 0.027 g。实验结果表明, 随着转基因蓝藻疫苗剂量的增加, 实验组对虾的成活率有所提高, 说明转基因蓝藻疫苗可显著增强虾对 WSSV 的抵抗能力, 且一定剂量范围内, 剂量越高抗 WSSV 的能力越强; ED_{50} 可为后续产业化应用转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗提供剂量依据。

测定转基因蓝藻 ED_{50} 后投喂斑马鱼。酶活实验中, 使用转基因蓝藻投喂后斑马鱼 T-SOD 酶活力并无显著变化, 表明转基因蓝藻的投喂对斑马鱼的 T-SOD 酶活力基本无影响; POD 的含量随着投喂日的增长而呈现降低趋势, 表明投喂后斑马鱼的抗氧化能力降低; 空白组和野生型组的 CAT 酶活力后期均有明显升高, 但转基因组的 CAT 酶活力在降低后 15 d 恢复初始投喂时的水平。

陈昌生等^[23]研究发现, 低浓度氨氮会诱导 CAT 酶活力增强, 且随着浓度增加, 其诱导性增强, 但达到一定的氨氮浓度后, 随着浓度增加, 会降低 CAT 酶活力。本实验中氨氮在 7 d 时显著提高, 喂养期间斑马鱼的排泄物、饲料残饵等分解后产生的含氮的中间产物大部分以氨的形式存在, 氨氮含量的提升致使空白组和野生型组的 CAT 有了显著提升, 与韩力强等^[24]、许星鸿等^[25]的研究结果一致。投喂期间转基因组斑马鱼的 POD 活性下降、抗氧化性降低、CAT 活性在 7 d 时出现下降, 表明转基因组抗氧化能力降低的同时, 高含量的氨氮已经对斑马鱼造成损伤, 致使酶活性下降, 在 9 d 氨氮达到最高水平时, CAT 活性仍呈降低趋势。邱德全等^[26]发现, 短时期相对低浓度的氨氮会刺激酶活力, 如果养殖水环境中的氨氮长时间维持在较高水平 (>0.5 mg/L) 则会导致过氧化氢酶活性

一直呈下降趋势。在低浓度范围内随着氨氮浓度增加, CAT 酶活性随之增加, 以维持体内氧化还原平衡, 当氨氮超过一定浓度范围后, 则会对机体造成损伤, 从而导致酶活性下降。说明养殖水体中氨氮含量的提升对斑马鱼的抗氧化能力存在一定影响。

急性毒性是药物安全性评价的重要指标之一, 处于药物毒理研究的早期阶段, 对阐明药物的毒性作用和了解其毒性靶器官具有重要意义^[27]。使用转基因蓝藻进行投喂, 存活实验中未发现斑马鱼的死亡, 其游动行为正常, 使用 MS-222 麻醉斑马鱼进行表征观察发现鱼体无异常; 急性毒性实验中, 组织切片结果发现, 转基因蓝藻对斑马鱼的心脏组织细胞并无显著影响, 肝脏组织细胞则出现轻微空泡等现象, 但细胞未见消失、胀大和破裂等情况, 推测由于斑马鱼抗氧化能力下降, 肝脏组织受到养殖水体中自由基的损伤, 肝脏组织细胞出现轻微受损, 但实验期内斑马鱼未出现死亡, 活动行为正常, 表明转基因蓝藻的毒理作用并不明显。

前人已经通过实验证明, 转基因 *vp28* 蓝藻口服疫苗能显著增强凡纳滨对虾抗 WSSV 的能力并延缓死亡^[10], 且蓝藻本身可作为幼虾饵料直接投喂, 因此, 投喂转基因蓝藻具有“药食同源”的功效。有研究发现, 蓝藻对斑马鱼的安全评价多集中在铜绿微囊藻 LR 毒素等自身含毒素的藻种, 对于转基因蓝藻的环境释放安全方面的研究相对较少, 殷嵘等^[28]和吴倩萍等^[29]分别通过 pH 法和冻融法进行了控制转基因蓝藻环境释放的实验, 结果表明, 转基因蓝藻不会进行增殖, 且保留了转基因重组蛋白, 保证药效稳定传递的同时阻止其在环境中的生长, 降低其对环境的影响。本研究发现, 转基因蓝藻达到抗

WSSV 的剂量需求时,不会对水域生态环境造成影响,有效避免了投喂药物后存在水体污染、水生动物生理异常等情况。本研究为后续转基因蓝藻亚单位疫苗的产业化使用提供了应用基础。

参考文献 (References):

- [1] Flegel T W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13(4): 433-442.
- [2] 殷嵘, 郭媛媛, 韦章良, 等. 不同途径感染白斑综合征病毒(WSSV)对日本沼虾的致病性[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(6): 946-956.
Yin R, Guo Y Y, Wei Z L, *et al.* Pathogenicity of white-spot syndrome virus in *Macrobrachium nipponensis* via different infection routes[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6): 946-956(in Chinese).
- [3] 傅玲琳, 帅江冰, 许梓荣. 对虾白斑综合征病毒的分子生物学研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2005, 41(4): 42-44.
Fu L L, Shuai J B, Xu Z R. Recent advances in the molecular biology of white spot syndrome virus of prawns[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(4): 42-44(in Chinese).
- [4] 衣启麟, 王玲玲, 宋林生. 对虾白斑综合征及其免疫防控[J]. *生命科学*, 2014, 26(9): 903-911.
Yi Q L, W L L, Song L S. White spot syndrome in shrimp and its immunological prevention and control[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2014, 26(9): 903-911(in Chinese).
- [5] Li Z J, Lin Q S, Chen J, *et al.* Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(9): 1609-1620.
- [6] Sánchez-Paz A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(6): 43.
- [7] Xie X X, Xu L M, Yang F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus[J]. *Journal of Virology*, 2006, 80(21): 10615-10623.
- [8] Zhang H D, Kolb F A, Brondani V, *et al.* Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(21): 5875-5885.
- [9] 王晓雯. 凡纳滨对虾与 WSSV 侵染相关的细胞与基因功能分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Wang X W. Functional analysis of the cells and the gene related with WSSV infection in *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese).
- [10] Li Z C, Xu L M, Li F, *et al.* Analysis of white spot syndrome virus envelope protein complexome by two-dimensional blue native/SDS PAGE combined with mass spectrometry[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(7): 1125-1135.
- [11] 席超, 王春梅, 施定基. 蓝藻基因工程应用研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(3): 105-111.
Xi C, Wang C M, Shi D J. Advances on Cyanobacteria genetic engineering applications[J]. *China Biotechnology*, 2010, 30(3): 105-111 (in Chinese).
- [12] 贾睿, 朱婵, 庄旻敏, 等. 白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP19 及 VP28 的研究进展 [J]. *水产学报*, 2020, 44(5): 870-880.
Jia R, Zhu C, Zhuang M M, *et al.* Review of research progress on white spot syndrome virus (WSSV) envelope protein VP19 and VP28[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(5): 870-880(in Chinese).
- [13] 郭媛媛, 殷嵘, 施定基, 等. 转 vp28 蓝藻口服剂对凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒能力 & 免疫反应的影响 [J]. *水产学报*, 2017, 41(9): 1473-1485.
Guo Y Y, Yin R, Shi D J, *et al.* Effect of *Anabaena*-expressed vp28 against white spot syndrome virus and related immune response in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(9): 1473-1485(in Chinese).
- [14] 谢菲, 陈晗, 李建明, 等. 斑马鱼在肿瘤研究中的应用 [J]. *中国热带医学*, 2009, 9(6): 1161-1164.
Xie F, Chen H, Li J M, *et al.* Application of zebrafish in cancer research[J]. *China Tropical Medicine*, 2009, 9(6): 1161-1164(in Chinese).
- [15] Gao Y J, Zhu H J, Chen Y, *et al.* Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry1C and Cry2A with a zebrafish embryotoxicity testth a zebrafish embryotoxicity test[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(17): 4336-4344.
- [16] 董姗姗, 章嫡妮, 张振华, 等. 转 mCry1Ac 基因玉米 BT799 对斑马鱼的生态毒理学效应 [J]. *应用生态学报*, 2019, 30(8): 2845-2853.
Dong S S, Zhang D N, Zhang Z H, *et al.* Ecotoxicological effects of transgenic mCry1Ac maize (BT799) on *中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries*

- zebrafish[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(8): 2845-2853(in Chinese).
- [17] 施定基, 王永旭, 方昭希. 固定化对多变鱼腥藻突变种及其野生型的光合、生长、固氮和泌氮的影响[J]. *植物学报*, 1991, 33(5): 335-342.
- Shi D J, Wang Y X, Fang Z X. The effects of immobilization on photosynthesis, growth, nitrogen fixation and ammonium ion excretion of mutant and wild type cells of *Anabaena variabilis*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1991, 33(5): 335-342(in Chinese).
- [18] GB 11893-89, 水质—总磷的测定——钼酸铵分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989.
- GB 11893-89, Water quality - determination of total phosphorus - ammonium molybdate spectrophotometric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 1989.
- [19] HJ 636-2012, 水质—总氮的测定——碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2012.
- HJ 636-2012, Water quality-determination of total nitrogen - alkaline potassium persulfate digestion UV spectrophotometric method[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2012.
- [20] HJ536-2009, 水质—氨氮的测定——水杨酸分光光度法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010.
- HJ536-2009, Water quality-determination of ammonia nitrogen - salicylic acid spectrophotometry[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2010.
- [21] 封琦, 朱光来, 王建国, 等. 氨氮对中华鲟的急性毒性及2种代谢酶活性的影响[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(1): 91-96.
- Feng Q, Zhu G L, Wang J G, *et al.* Acutetoxicity of ammonia nitrogen to *Rhedeus sinensis* and its effects on two metabolism enzymes[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(1): 91-96(in Chinese).
- [22] Subhadra B, Hurwitz I, Fieck A, *et al.* Development of paratransgenic *Artemia* as a platform for control of infectious diseases in shrimp mariculture[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 831-840.
- [23] 陈昌生, 王淑红, 纪德华, 等. 氨氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2001, 10(3): 218-222.
- Chen C S, Wang S H, Ji D H, *et al.* Effects of ammonia-N on activities of CAT and SOD in *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2001, 10(3): 218-222(in Chinese).
- [24] 韩力强, 康现江, 李双石, 等. 氨氮对斑马鱼2种代谢酶类的影响[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2005, 25(2): 179-184.
- Han L Q, Kang X J, Li S S, *et al.* Effects of ammonia nitrogen on metabolic enzymes in *Brachydanio rerio*[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2005, 25(2): 179-184(in Chinese).
- [25] 许星鸿, 张雁秋, 阎斌伦, 等. 氨氮胁迫对日本鲟免疫生理指标及器官结构的影响[J]. *生态学报*, 2014, 34(14): 3885-3894.
- Xu X H, Zhang Y Q, Yan B L, *et al.* Effects of ammonia-N stress on immunity-related indicators and histological structure of some organs of the marine crab, *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(14): 3885-3894(in Chinese).
- [26] 邱德全, 杨士平, 邱明生. 氨氮促使携带白斑综合征病毒凡纳滨对虾发病及其血细胞、酚氧化酶和过氧化氢酶变化[J]. *渔业现代化*, 2007, 34(1): 36-39.
- Qiu D Q, Yang S P, Qiu M S. Effect of ammonia on disease of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* with WSSV[J]. *Fishery Modernization*, 2007, 34(1): 36-39(in Chinese).
- [27] 姜玮. 基于模式生物斑马鱼的“藻戟遂苳俱战草”急性毒性相互作用研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- Jiang W. Study on acute toxicity and interaction of the “Haizao, Daji, Gansui and Yuanhua Reverse Gancao” based on zebrafish[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2012 (in Chinese).
- [28] 殷嵘, 顾娟, 施定基, 等. pH法防止转基因蓝藻向环境释放[J]. *生物技术*, 2017, 27(6): 592-600.
- Yin R, Gu J, Shi D J, *et al.* pH method to prevent the release of transgenic *Anabaena* sp. into environment[J]. *Biotechnology*, 2017, 27(6): 592-600(in Chinese).
- [29] 吴倩萍, 刘海萍, 顾娟, 等. 冻融法控制制药用转基因蓝藻在环境中释放[J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(2): 25-31.
- Wu Q P, Liu H P, Gu J, *et al.* Controlling environmental release of transgenic cyanobacteria used to prepare recombinant drug by freezing-thawing way inhibitor metyrapone[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2018, 37(2): 25-31(in Chinese).

Determination of ED₅₀ of transgenic cyanobacteria oral vaccine and safety evaluation on *Danio rerio*

XU Yang¹, XIE Jingkun¹, LI Yunhui¹, SU Yongzheng¹, HE Peimin^{1,2}, JIA Rui^{1,2*}

(1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Water Environment & Ecology Engineering Research Center of Shanghai Institute of Higher Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Nowadays, in aquaculture, the popularity of antibiotics and the increase in the use of other drugs have made it easier for residual antibiotics and drugs to invade natural water bodies. The environmental effects of antibiotics in the ecosystem have caused more and more pollution to the water environment and threatened the survival of aquatic organisms. After strict regulation and control of the use of antibiotics, the use of genetically modified vaccines that can replace antibiotics has become more and more common. Cyanobacteria is a natural bait for shrimp seedlings. Directly feeding *Litopenaeus vannamei* with *Synechococcus*-expressed vp28 to control WSSV can play a role of “medicinal and food homology”. However, the problem facing the current application of transgenic cyanobacteria as a subunit vaccine is the safety of its environmental release. *Danio rerio* is one of the most commonly used model creatures. In the previous *Synechococcus*-expressed vp28 oral vaccine efficacy experiment, the feasibility of the oral vaccine was verified, showing that its efficacy and safety can be trusted. This environmental release experiment was built on this basis. In this study, *Synechococcus*-expressed vp28 were administered to *L. vannamei* to verify the effect of its dose gradient against WSSV and to determine its half effective dose (ED₅₀). After feeding *D. rerio* on the basis of this ED₅₀, the effects of the *Synechococcus*-expressed vp28 on aquatic organisms and water environment were explored by measuring the enzymatic indicators in *D. rerio*, observing the tissue sections, and the changes in nitrogen and phosphorus in the aquaculture water. The results of the study showed that with the increase of the dose of *Synechococcus*-expressed vp28 oral vaccine, the anti-WSSV efficacy of *L. vannamei* also increased and the measured ED₅₀ was 0.027 g. Feeding *D. rerio* by freeze-dried wild-type and transgenic *Synechococcus* with the shelled-out *Artemia* for 15 days, the body length and color of *D. rerio* were not significantly different. The CAT in the transgenic group was significantly lower than that blank and wild-type groups. There was no significant difference in SOD and POD between wild-type and transgenic groups. There was no significant difference in the liver and heart of *D. rerio* through the tissue section. The ammonia nitrogen in wild-type and transgenic groups was lower than that in the blank group, and there was no significant difference between total nitrogen and total phosphorus. The results of this study further showed that the *Synechococcus*-expressed vp28 can effectively enhance the anti-WSSV ability of *L. vannamei*, and as its dose increases, the disease resistance has a more significant expression. In the current experimental results, there is no obvious toxicological effect on *D. rerio*, and after feeding with *Synechococcus*-expressed vp28, it does not show a significant effect on the quality of aquaculture water. This shows that this subunit vaccine has less impact on aquatic organisms, and can provide a basis and more possibilities for subsequent industrial-scale applications and development.

Key words: transgenic cyanobacteria; *Danio rerio*; vp28; median effective dose (ED₅₀); safety

Corresponding author: JIA Rui. E-mail: rjia@shou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Project (2019YFC0312604); Shanghai Agriculture Science and Technology Innovation Project (2017, 1-13); National High Technology Research and Development Program of China (2014AA093506); Student Innovation Training Project (S201910264057)