

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 97/5/401

※申請日期： 97-12-30

※IPC 分類：

C12N15/82 (2006.01)

C12N1/12 (2006.01)

A23K1/18

(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於藻類之核酸及其用途/ NUCLEIC ACID FOR USE IN ALGAE
AND USE THEREOF

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立台灣大學/ NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

代表人：(中文/英文)

李嗣涔/ LEE, SI-CHEN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北市羅斯福路四段一號/ NO.1, SEC. 4, ROOSEVELT RD., DA-AN
DISTRICT, TAIPEI CITY 106, TAIWAN (R.O.C.).

國籍：(中文/英文)

中華民國/ R.O.C.

三、發明人：(共 2 人)

姓名：(中文/英文)

1. 蔡懷楨/ TSAI, HUAI-JEN

2. 李思賢/ LI, SI-SHEN

國籍：(中文/英文)

1. 中華民國/ R.O.C.

2. 中華民國/ R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，
其事實發生日期為：2008年7月19日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種可在藻類中轉譯出牛乳鐵蛋白（LFB）之核酸，及其將其導入藻類之基因轉殖技術及其相關用途。

【先前技術】

擬球藻是一種無性生殖的海水微藻，在分類學上屬於金藻門（*Chrysophycophyta*）、真眼點藻綱（*Eustigmatophyceae*）、真眼點藻目（*Eustigmatales*）、單珠藻科（*Monodopsidaceae*）、擬球藻屬（*Nannochloropsis*），為一圓球型之真核單細胞藻類。其直徑為2到 4×10^{-6} 公尺、無鞭毛（flagellum）、無眼點（eyespot），具有堅韌的細胞壁與相當厚的細胞外構造，外觀與綠球藻（*Chlorella vulgaris*）極為相似，故稱之為擬球藻，是魚蝦貝類的天然餌料之一。由於其具有增殖速度快、培養成本低等優勢，目前被廣泛使用在台灣的海水種苗與餌料生物輪蟲的生產。此外，由於擬球藻含有高量的不飽和脂肪酸（eicosapentaenoic acid, EPA）（Apt K. E.及Behrens P. W. 1999 Commercial developments in microalgal biotechnology. J Phycol 35: 215-226），也能作為食品添加物或健康食品，具有高度的經濟價值。

由於擬球藻是真核生物，因此它不僅能像細菌般快速生長，還能進行細菌等原核生物無法做到的轉錄與轉譯後修飾（Lin Cereghino

G.P.L.及 Gregg J.M. 1999 Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 10: 422-427 ; Swartz J.R. 2001 Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins.. *Curr Opin Biotechnol.* 12: 195-201) , 這使得擬球藻能夠生產許多原核系統生物反應器所不能製造的複雜蛋白質。與陸生植物相比,由於陸生植物的生長週期多半長達一至兩年,從轉殖株篩選到種子數量足以進行大規模生產往往需耗時三年以上。但擬球藻在環境適合的情況下能在幾小時內就能完成其生長週期,可大幅縮短轉殖株篩選與放大所需的時間。除了生長快速之外,由於擬球藻不產生配子,不會像陸生植物般因為花粉的傳播,而使得野生種被基因改造物種的配子所污染,進而造成生態問題。且由於擬球藻是海水物種,其生產過程不會如陸生植物般耗用大量的淡水與可耕地,因此更有利於商業化的進行。

【發明內容】

擬球藻是一種非常有潛力的生物反應器,且擬球藻的藻種冷凍保種技術也已完成 (Poncet J.M, Veron B. 2003 Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata*, *Biotechnol Lett.* 25: 2017-2022) 。因此若能將擬球藻以基因轉殖技術改造成生物反應器,將可使擬球藻成為非常有應用價值的生物材料生產平台。

本發明即是以擬球藻為對象,透過基因轉殖技術使其具有能生產功

能性蛋白之能力，而解決目前生物反應器時常遇到的高使用成本（例如：細胞培養）與高時間成本（例如：陸生植物生物反應器）兩大問題。本發明之生物反應器運作時還能吸收二氧化碳，不需耗用有限的淡水與可耕地，且能以口服投餵方式直接將產物送於魚蝦貝體內，能大幅降低水產疫苗、抗菌蛋白與生長激素的生產與使用成本，成為一低成本且兼具環保與二氧化碳減量功能之生物反應器。

此外，由於擬球藻能產生糖類及脂肪，可作為生質酒精與生質柴油之原料，本發明能運用於提升擬球藻之生質能源生產效率，故本發明之生物反應器另可應用於生質能源之開發；而由於擬球藻生長過程會吸附大量二氧化碳，本發明能運用於提升擬球藻之二氧化碳吸附效率，有助於溫室氣體之減量；再者，擬球藻是目前水產養殖業常用之餌料生物，本發明可用來生產水產口服抗菌蛋白、口服疫苗與口服生長激素等，能發揮降低水產養殖成本與提升產業競爭力。

本發明將三種不同的外源性基因轉殖到擬球藻，此三種基因為促進魚類生長的黃鰭鯛生長激素（rGH）、可代替抗生素的融合蛋白【紅螢光（DsRed）與牛乳鐵蛋白（Bovine lactoferricin，LFB）】及可作為疫苗的草蝦白點病病毒之表面膜蛋白（VP28）。經過 DNA、RNA、蛋白質與生物活性試驗的檢測後，能清楚的顯示本發明能成功的完成擬球藻基因轉殖，使擬球藻生產這三種來源、特性與功能都不相

同的外源性蛋白，且這些由擬球藻生產的外源性蛋白同樣具有生物活性。

是以，本發明提供一種可在藻類中表現之核酸，其係由編碼 SEQ ID NO：3 所示之核苷酸序列所組成，其中該核苷酸可於藻類中轉譯出牛乳鐵蛋白（LFB）。

在本發明之較佳實施例中，該核酸另可與編碼螢光蛋白之序列做操作性連接，轉譯出牛乳鐵蛋白與螢光蛋白的融合蛋白，其中螢光蛋白係作為篩選藻株之標記（selectable marker），會在成功轉殖之藻株中發出螢光。傳統基因轉殖常以抗生素抗性作為篩選標記，以區別轉殖與非轉殖細胞，但使用抗抗生素基因可能會帶來食用安全性和生態破壞的疑慮。本發明以螢光作為篩選標記，對於食用方面和環境影響是不具危險性的。

在本發明之更佳實施例中，該核酸另可與編碼紅螢光蛋白（DsRed）之序列做操作性連接，產生包含編碼如 SEQ ID NO：2 所示之核苷酸序列，該序列可轉譯出牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白（LFB-DsRed），其中 LFB 與 DsRed 接合處包含一胃蛋白酶裁切位置。

在本發明之最佳實施例中，該核酸另可操作性連接上一啟動子，其中該啟動子係編碼如 SEQ ID NO：1 所示之核苷酸序列。

本發明之較佳實施例中，該藻類係單細胞藻類。

本發明之更佳實施例中，該藻類係選自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Ceratoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻 (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。

本發明之最佳實施例中，該藻類係擬球藻。

本發明又提供一種在藻類中產生外源性基因產物的方法，其包含步驟如下：a. 使用蛋白分解酵素液削弱或移除藻類細胞壁，使其適合進行基因轉殖；b. 將編碼外源性基因產物之基因轉殖入藻類中；及c. 表現外源性基因得到外源性基因產物。

本發明之用語『外源性基因』係指非實驗藻類本身所擁有的基因，其來源可為細菌、真菌、病毒、植物或動物。本發明之最佳實施例中，該外源性基因係包含牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白（LFB-DsRed）基因、草蝦白點病病毒表面蛋白（VP28）基因、或黃鰭鯛生長激素（rYGH）基因。

本發明之較佳實施例中，轉殖後的外源性基因產物具有包含抗菌、抗病毒、或增加生長速率等之生物活性；本發明之最佳實施例中，該生物活性係包含可抗腸炎弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）、可抗白點病病毒（white spot syndrome baculovirus）、或可增加生長速率 2 到 3 倍。

本發明之用語『蛋白分解酵素』係指可分解蛋白質的酵素，並無來源限制，包括自然（野生型）的蛋白分解酵素，以及其任何具有酵素活性的突變形（mutants）、變異型（variants）、或片段（fragments）等等，亦包含如合成蛋白酶之重組蛋白酵素。

本發明中之『蛋白分解酵素』包括但不限於胃蛋白酶 A。

本發明之用語『蛋白分解酵素液』係指包含蛋白分解酵素及可活化該酵素之環境溶液的混合溶液。在本發明之較佳實施例中，該蛋白分解酵素液係包含鹽酸、氯化鉀、及胃蛋白酶 A 的合成胃液；在本發明之最佳實施例中，該合成胃液係包含 150 mM 鹽酸、15 mM 氯化鉀、

及 5% 胃蛋白酶 A。

傳統電穿孔轉殖法係使用纖維素酶處理酵母菌細胞壁以進行電穿孔轉殖，但用於藻類卻效果不彰。本發明利用蛋白分解酵素，可有效率地削弱或移除藻類細胞壁，使其適合進行基因轉殖。

本發明之較佳實施例中，該藻類係以 f/2 培養基，培養於光源為白色日光燈的 27°C 恆溫培養箱，並提供 10 小時光照及 14 小時黑暗的光照週期。

本發明之較佳實施例中，係使用電穿孔轉殖法將編碼外源性基因產物之基因轉殖入藻類中；電穿孔轉殖條件係包含電壓值 2000 V/mm、脈衝時間 20 微秒、及脈衝次數 10 次。

本發明之較佳實施例中，該藻類係單細胞藻類。

本發明之更佳實施例中，該藻類係選自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Cheatoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、

擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻 (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。

本發明之最佳實施例中，該藻類係擬球藻。

本發明更提供一種基因轉殖藻類，其細胞壁係使用蛋白分解酵素液來削弱或移除。在本發明之較佳實施例中，該蛋白分解酵素液係包含鹽酸、氯化鉀、及胃蛋白酶 A 的合成胃液；在本發明之最佳實施例中，該合成胃液係包含 150 mM 鹽酸、15 mM 氯化鉀、及 5% 胃蛋白酶 A。

本發明之較佳實施例中，該藻類包含編碼外源性基因產物之轉殖基因；其中該外源性基因係來自細菌、真菌、病毒、植物或動物。

本發明之最佳實施例中，該外源性基因係包含牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白 (LFB-DsRed) 基因、草蝦白點病病毒表面蛋白 (VP28) 基因、或黃鰭鯛生長激素 (rYGH) 基因。

本發明之較佳實施例中，該外源性基因產物可在藻類中表現並具有包含抗菌、抗病毒、或增加生長速率等之生物活性；本發明之最佳實施例中，該生物活性係包含可抗腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、

可抗白點病病毒 (white spot syndrome baculovirus)、或可增加生長速率 2 到 3 倍。

本發明之較佳實施例中，該藻類係單細胞藻類。

本發明之更佳實施例中，該藻類係選自一種來自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Cheatoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻 (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。

本發明之最佳實施例中，該藻類係擬球藻。

本發明尚提供一種飼料組合物，其包含一種基因轉殖藻類或其子代，其中該基因轉殖藻類之細胞壁係使用蛋白分解酵素液來削弱或移除。在本發明之較佳實施例中，該蛋白分解酵素液係包含鹽酸、氯化鉀、及胃蛋白酶 A 的合成胃液；在本發明之最佳實施例中，該合成

胃液係包含 150 mM 鹽酸、15 mM 氯化鉀、及 5% 胃蛋白酶 A。

本發明之較佳實施例中，該基因轉殖藻類係包含編碼外源性基因產物之轉殖基因，其中該外源性基因係來自細菌、真菌、病毒、植物或動物。

本發明之最佳實施例中，該外源性基因係包含牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白 (LFB-DsRed) 基因、草蝦白點病病毒表面蛋白 (VP28) 基因、或黃鰭鯛生長激素 (rYGH) 基因。

本發明之較佳實施例中，該外源性基因產物可在藻類中表現並具有包含抗菌、抗病毒、或增加生長速率等之生物活性；本發明之最佳實施例中，該生物活性係包含可抗腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、可抗白點病病毒 (white spot syndrome baculovirus)、或可增加生長速率 2 到 3 倍。

本發明之較佳實施例中，該藻類係單細胞藻類。

本發明之更佳實施例中，該藻類係選自一種來自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Cheatoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈

藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻 (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。

本發明之最佳實施例中，該藻類係擬球藻。

本發明之較佳實施例中，該組合物係用於餵食水生生物；本發明之最佳實施例中，該水生生物係魚或蝦。

【實施方式】

雖然本發明已以較佳實施例揭露如下，然其並非用以限定本發明。任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，所為之更動與潤飾，均屬發明作之專利保護範圍。關於發明作之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

本發明實施及試驗的過程為，首先建構出藻類表現載體做好準備，並將擬球藻培養至適當濃度，然後以合成胃液 (Synthetic gastric juice) 處理擬球藻，削弱擬球藻的細胞壁，使其適合以電穿孔法進行基因轉殖，接著即以電穿孔法將外源性基因片段轉殖進入擬球藻原生質體中，轉殖後之擬球藻經過培養，即可選取單株藻株進行放大培養，運

用DNA萃取、聚合酶鏈放大反應、mRNA萃取、反轉錄聚合酶鏈放大反應、蛋白質抽取及電泳、西方墨點法等方式檢測轉殖後之基因表現狀況，並根據不同的轉殖基因，分別以成長實驗、溶菌環實驗、感染實驗等方法進行檢測，確定由基因轉殖技術改造的擬球藻所表現的外源性蛋白是否具有正常功能。

實施例1 載體建構及準備

自Schroda *et al.*(Schroda M, Blocker D, Beck CF. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in Chlamydomonas. Plant J 2000;21:121-31)處取得藻類表現載體的促進啟動子「Hsp70A+RBCS 2」(SEQ ID NO:1)。藉由該啟動子表現之紅螢光蛋白(DsRed)與牛乳鐵蛋白(LFB)之融合蛋白(LFB-DsRed)的互補DNA(Complementary DNA, cDNA)(SEQ ID NO:2)，則可利用下述連續聚合酶連鎖反應(sequential PCR)產生。首先，模板使用含珊瑚(*Discosoma sp.*)之DsRed cDNA的pDsRed 2-1(Clontech)質體。根據用藻類密碼子最佳化後的LFB cDNA(SEQ ID NO:3)設計3段前置引子及1段反置引子。3段前置引子分別為CF3 (GC TAGCACCGGTCGCCACCATGTTCAAATGTCGTCGTTGGCAATGG CGT(SEQ ID NO:4))、CF2 (GCAATGGCGTATGAAAAAATT AGGTGCTCCTTCTATTAC(SEQ ID NO:5))、及CF1 (CTTCTATT ACATGTGTACGTCGTGCTTTCATGGCCTCCT(SEQ ID NO:6))。反置引子則為CR (ATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATT

(SEQ ID NO: 7))。第一次PCR反應使用引子CF1和CR，進行下列設定5個循環：94°C解離 (denaturation) 30秒、30°C黏合 (annealing) 15秒、及72°C延展 (extension) 90秒。接著再進行下列設定20個循環：94°C解離30秒、60°C黏合15秒、及72°C延展90秒。以2%的洋菜膠電泳分析後取出PCR產物，並將該產物用作為第二次PCR反應 (同樣設定但使用引子CF2和CR) 的模板DNA。將第二次PCR反應的產物再作為第三次PCR反應 (同樣設定但使用引子CF3和CR) 的模板DNA。將最終PCR反應的產物克隆 (clone) 至pGEM-T easy質體上。質體經限制酵素 (NheI及EcoRV) 處理後，插入pCB740載體的NheI-EcoRV切口處，便成為可在藻類表現LFB的載體 (phr-rLFB-Red)。該載體使用酵素 (SacII) 線性化，以作為之後基因轉殖之準備。

實施例2 擬球藻類培養

將擬球藻培養在27°C及以白色日光燈當光源的恆溫培養箱中，使用f/2培養基 (5 mg/l之磷酸二氫鈉 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、75 mg/l之硝酸鈉、1 mg/l之生物素、1 mg/l之維生素B12、及200 mg/l之維生素B1) 並以1:1000的比例加入微量元素 (4.36 g/l之乙二胺四乙酸二鈉鹽 (Na_2EDTA)、3.15 g/l之氯化鐵 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)、9.8 g/l之硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)、22 g/l之七水硫酸鋅 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)、10 g/l之氯化鈷 ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)、18 g/l之氯化錳 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、及6.3 g/l之鉬酸鈉 ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)) 進行培養。其光照週期為10小時光照及14小時黑暗。當其濃度達到 1×10^7 cells/ml時即可進行基因轉殖處理。

實施例3 擬球藻原生質體細胞壁處理

取40毫升之對數生長期 (log phase) 的野生種藻株，以8000 rpm於4°C離心10分鐘。每管懸浮於0.5毫升的合成胃液 (150 mM鹽酸、15 mM氯化鉀、及5%胃蛋白酶A (來自豬的胃黏膜, Sigma 114k0058))，在37°C下作用1小時。之後以8000 rpm於4°C離心5分鐘，懸浮於1毫升滅菌過的海水並沖洗2次。接著在6000 rpm 4°C離心5分鐘，將沉澱物懸浮於70微升的EB2混合溶液 (80 mM氯化鉀、5 mM氯化鈣、10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 4-羥乙基乙磺酸)、0.2 M甘露醇、及0.2 M山梨醇)。結果顯示合成胃液能將擬球藻分解，並能在適當的處理時間 (30~60分鐘) 下達到削弱細胞壁的作用 (擬球藻由綠色變褐色) (圖2)，使其適合以電穿孔法進行基因轉殖。

實施例4 電穿孔轉殖與篩選

將上述的EB2混合溶液與10微克已線性化之外源性基因片段【分別為可表現紅螢光(DsRed)與牛乳鐵蛋白(LFB)之融合蛋白基因(SEQ ID NO: 2)、草蝦白點病病毒表面蛋白 (VP28) (SEQ ID NO: 8)、黃鰭鯛生長激素 (rYGH) (SEQ ID NO: 9) 之藻類表現質體 (圖1)】混合後，置入電極板間隔為2毫米的電穿孔專用小玻璃管 (cuvette) 中，再置入電穿孔儀 (electro square porator ECM T2001 BTX, USA) 的安全座中進行電穿孔基因轉殖。電穿孔條件為電壓值 2000 V/mm、脈衝時間 20 微秒、及脈衝次數 10 次。電破處理完成後，加入 1 毫升

之 f/2 培養基培養 24 小時，之後取 40 微升塗在海水培養基，在 27°C 持續光照下培養約 10 天後。選取單株藻株進行放大培養以進行後續實驗。

穩定的轉殖藻株【轉殖含有紅螢光 (DsRed) 與牛乳鐵蛋白 (LFB) 之融合蛋白基因】能在藻落周圍形成橙色圓環，且此一橙色圓環能在螢光顯微鏡下發出紅色螢光。將轉殖擬球藻於洋菜培養基上培養六十天後，在轉殖藻株中有兩株 (0829A 及 0829B) 能在藻落周圍產生橙色圓環 (圖 4A)。這些圓環能在螢光顯微鏡下觀察到紅螢光產生 (圖 4E)。所用的激發光濾鏡為 560 毫微米，發射光濾鏡為 610 毫微米。這兩株藻株經往後 DNA、RNA 與蛋白質的檢測後證明的確帶有並能表現所轉殖的外源性基因。

實施例5 藻類genomic DNA萃取

取 1 毫升藻液，於 8500 rpm 4°C 離心 20 分鐘，倒掉上清液，將 400 微升的 DNA 萃取緩衝液 (2% 溴代十六烷基三乙基銨 (cetyltrimethylammonium bromide)、0.1M 三羥甲基氨基甲烷 (Tris-HCl) (pH 8.0)、10mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)、1.4M 氯化鈉、及 2%β-硫氫乙醇 (β-mercaptoethanol))，加入 1.5 毫升離心管渦流震盪 (vortex) 混合均勻後於 65°C 水浴 1 小時，每 15 分鐘搖晃均勻一次。加入同體積之酚：氯仿 (phenol : chloroform) 為 1:1 之溶液混勻，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，取上層溶液到新的離心管中加入兩倍體積的 100% 酒精，

置於-20°C 冰箱沉澱至少兩小時。之後在 4°C 下以 13000 rpm 離心 10 分鐘，再用 70% 酒精直接沖洗沉澱物 (pellet) 兩次 (每次沖洗後以 13000 rpm 進行離心 5 分鐘)，再以真空抽氣機乾燥得到沉澱物。最後加入 40 微升的二次蒸餾水 (ddH₂O) 到樣品中，再放入 55°C 加熱處理 10 分鐘後於-20°C 保存備用。

實施例6 轉殖藻株的聚合酶鏈放大反應檢測

以聚合酶鏈放大反應檢測擬球藻株 (*Nannochloropsis oculata*) 是否有藻類表現質體。以萃取出擬球藻基因組 DNA (genomic DNA) 作為模版，以轉殖基因的專一性引子 (DF : CCTCCTCCGAGAACGTCATCACCGAG (SEQ ID NO : 10) ; DR : CCTCGGTGCGCTCGTACTGCT (SEQ ID NO : 11)) 偵測轉殖藻株細胞內外源性基因的存在。再配合可偵測內生性 18S rRNA 基因的引子 (nannos sF : GCGGAGGAAAAGAACTAACCAGGATT (SEQ ID NO : 12) 及 nannos sR : AACGCCATGGCACAACCGC (SEQ ID NO : 13)) 作為內控制組，在聚合酶鏈反應儀器 (GeneAmp PCR system 9700, Perkin Elmer, USA) 中進行 35 循環，其中包含了 94°C 解離 (denature) 30 秒、60°C 黏合 (annealing) 30 秒、及 72°C 延展 (extension) 30 秒。所有 PCR 的產物，取 10 微升於 1.5% 的洋菜膠體中進行電泳分析。其結果顯示外源性基因能在電壓值 2000 V/mm、脈衝時間 20 微秒、及脈衝次數 10 次的電穿孔處理條件下，成功的進入擬球藻體內，並在第一代達到 100% 的轉殖率 (圖 3)。

實施例7 藻類mRNA的萃取

當藻株培養到濃度約 1×10^7 cell/ml後，取50毫升藻液在 4°C 下以8000 rpm離心5分鐘。加入1毫升的RNA分離試劑 (TRI® Reagent RNA Isolation Reagent) (Sigma Chemicals, St. Louis, USA)，渦流震盪30秒後靜置冰上30秒。將此步驟重複5次後加入200微升氯仿，在室溫下旋轉混合10~15分鐘 (或渦流震盪2分鐘，冰上靜置10分鐘)。於 4°C 以10000 rpm離心30分鐘，吸上清液，加入適量RQ1無核糖核酸酶 (RNase) 之去氧核糖核酸酶 I (DNase I) (Promega, M6101) 於 37°C 作用40分鐘，加入0.7倍體積異丙醇室溫沉澱15分鐘，於 4°C 以13000 rpm離心30分鐘，倒掉上清液，70%酒精洗鹽，於 4°C 以13000 rpm離心10分鐘，倒上清液，烘乾。加入50微升無核糖核酸酶的水，再加入等體積LiCl (為了去掉醣蛋白)， -20°C 沉澱至少三小時。之後在 4°C 下以13000 rpm離心30分鐘，倒上清液，70%酒精洗鹽， 4°C 全速離心10分鐘，倒上清液。烘乾後加30微升無核糖核酸酶的水回溶沉澱物，保存 -20°C 。

實施例8 反轉錄聚合酶鏈放大反應

使用反轉錄聚合酶鏈放大反應觀察擬球藻經熱休克誘導後細胞內轉殖基因表現情形。設計適當的引子，以PCR方式放大出轉殖基因的轉錄後產物。首先，取15微升RNA (2 ug)，加入1微升寡聚脫氧胸苷酸 (Oligo dT) 引子 (SEQ ID N0: 14)， 70°C 作用15分鐘 (雙股分離)，

加入 5 微升 5x M-MLV 反轉錄酶緩衝液、2 微升 10 mM 去氧核苷三磷酸 (dNTP)、1 微升 RNA 酶抑制劑 (rRNasin) (40U/ μ l, Promega, N2511)。在 42°C 作用 15 分鐘 (黏合)，再加入 1 微升 M-MLV 反轉錄酶於 42°C 作用 1 小時之後以 70°C 作用 15 分鐘 (去活化)。後冰上 3 分鐘，保存於 -20°C。

結果顯示外源性基因的確能在轉殖擬球藻中進行轉錄，且實驗並未遭到污染 (圖 5)。

實施例9 藻類蛋白質抽取及蛋白質電泳

將適量藻液以 8000 rpm 離心 20 分鐘的沉澱物溶在藻類蛋白質萃取緩衝液 (不含 10% 蔗糖) 裡，與 β -巰基乙醇及苯甲基磺氟 (pMSF) (200 mol/l) 加入內含滅菌處理過之小玻璃珠 (beads) 的 1.5 毫升微量離心管中。將每個微量離心管依序放到小型震盪式組織研磨器 (mini-beadbeater) 中搖晃均勻，每次 20 秒共 16 次。於 4°C 以 13000 rpm 離心 10 分鐘，吸出上清液至新的微量離心管裡，取 1/5 體積的 5x 樣品緩衝液 ((312.5 mM Tris-Cl (pH6.8)、20% 甘油 (v/v)、及 4.6% 十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate, SDS (w/v)) 至樣品中，均勻混合。將樣品放到 100°C 沸水中煮 5 分鐘 (使蛋白質變性)，置於冰上 5 分鐘，使不再作用以穩定之。在每個 1.5 毫米聚丙烯醯胺膠體槽 (polyacrylamide gel well) 裝載入 30 微升的樣品，以 130 伏特的電壓於電泳緩衝液 (25 mM 三羥甲基氨基甲烷 (Tris base)、0.192 M 甘氨酸、及 0.1% SDS (最後加入)) 作用 3 小時。

實施例10 西方點墨法

蛋白質電泳結束後將硝酸纖維膜 (nitrocellulose membrane)、適當大小的3毫米紙張以及海綿網置於轉膜緩衝液 (transfer buffer; 25 mM三羥甲基氨基甲烷 (Tris base)、0.192 M甘胺酸、及0.1% SDS (w/v) 潤濕15分鐘。將蛋白質電泳完成的膠體平鋪在3毫米紙張上，其上再鋪上硝酸纖維膜及3毫米紙張並放入轉印系統中，由負極往正極的方向放置 (不能有氣泡產生) 並開啟開關使電流維持在400毫安培轉印1小時。轉印完成後將硝酸纖維膜取出並浸泡在1 × TBS中 (Tris-HCl緩衝鹽溶液; 含150 mM氯化鈉、25 mM三苯基膦 (Tris) (pH 7.5)、5% 脫脂牛奶、及0.1% 乳化劑 (Tween 20))，於37°C 進行1.5小時或於4°C 進行12小時 (一整夜) 的阻隔作用 (blocking)。而後再用1 × PBST或TBST潤濕兩次，加入適當的一次抗體於TBS溶液中 (含1% 脫脂牛奶)，於4°C 作用一整夜或於25°C 作用1小時。接著用1 × PBST (磷酸鹽緩衝液 (PBS) 5×稀釋至1×並加入0.05% (v/v) Tween 20) 或TBST (含1% 脫脂牛奶及0.1% 乳化劑 (Tween 20)) 洗三次，每次15分鐘，再用1 × TBST潤濕兩次後浸泡在1 × TBS中，於37°C 進行阻隔作用 (blocking) 1.5小時。加入1 : 10000或1 : 20000的二級抗體於TBS溶液 (含1% 脫脂牛奶)，於25°C 作用1小時。用1 × PBST或TBST 洗三次，每次15分鐘。用偵測緩衝液 (detection buffer; 100 mM Tris pH 9.5、100 mM氯化鈉、5 mM 氯化鎂) 潤濕10分鐘。加入呈色劑 (NBT/BCIP) 靜置呈色 (每10毫升的偵測緩衝液加入200微升的NBT/BCIP貯存溶

液)。

結果顯示轉殖擬球藻在熱誘導處理後產生能被抗體標示外源性蛋白 (圖 6)。

實施例11 生物活性試驗

根據不同的轉殖基因，分別以成長實驗、溶菌環實驗、感染實驗等方法進行檢測，確定由基因轉殖技術改造的擬球藻所表現的外源性蛋白是否具有正常功能。

轉殖抗菌生肽的轉殖擬球藻經過消化後，以溶菌環實驗檢視其抗菌活性。不同體積的轉殖擬球藻 (1×10^7 cell/ml) 經過熱誘導處理後，利用合成胃液於 37°C 下處理 4 小時將其分解，並置於半徑 0.5 公分的圓形紙片上，在含有腸炎弧菌的培養基上於 37°C 下培養 16 小時。利用不同劑量的安比西林作為殺菌能力參考指標。其結果顯示經過熱誘導處理的轉殖擬球藻能在經過合成胃液分解後產生殺菌能力，每一個轉殖擬球藻細胞的殺菌能力相當於 3.6×10^{-8} 微克安比西林 (ampicillin) (圖 7)。

表 1. 以擬球藻餵食青鱈魚再以腸炎弧菌感染後 24 小時之存活率(%)

注射 感染	Dsw	W.T.	TL	TH
Dsw	95±7.1	95±7.1	95±7.1	100
Cont.	90	100	100	95±7.1
VP-L	15±7.1	10	65±21.2	95±7.1
VP-H	0	5±7.1	70	85±7.1

* Dsw: 10 µl 蒸餾海水

* Cont: 負控制組，高劑量的死菌 (煮沸 30 分鐘) *V. parahaemolyticus* (1×10^5 cells/fish)

* VP-L: 低劑量的活菌 *V. parahaemolyticus* (1×10^4 cells/fish)

* VP-H: 高劑量的活菌 *V. parahaemolyticus* (1×10^5 cells/fish)

* W.T.: 野生種擬球藻 (1×10^8 cells/fish)

* TL: 低劑量轉殖擬球藻 (1×10^6 cells/fish)

* TH: 高劑量轉殖擬球藻 (1×10^8 cells/ fish)

* 各組實驗樣本數均為 10，數據為三重覆後取平均值。

以口服注射的方式將擬球藻送入青鱈魚之消化道，並於 6 小時後以相同方式送入腸炎弧菌進行感染實驗。並於感染後 24 小時計算存活率。結果顯示轉殖擬球藻的確能保護青鱈魚不因腸炎弧菌的感染而死亡。其保護效果在 1×10^5 cells/fish 劑量的腸炎弧菌感染下可以達到八成以上的存活率，而餵食野生種擬球藻在同樣感染條件下的死亡率超過九成。這顯示擬球藻所表現的抗菌蛋白具有正常活性(表 1)。

將草蝦注射白點病毒以進行口服疫苗感染試驗，之後於特定天數計算草蝦死亡率。草蝦累積死亡率的統計結果分別來自餵食含野生藻、1/2 野生藻+1/2 轉殖藻、轉殖藻及餵食一般飼料的正控制組和負控制組的各個實驗組別 (N=10) 此為三次重複實驗平均值畫出的結果。正控制組和負控制組：餵食一般飼料；轉基因藻類：餵食包覆 VP28 轉殖藻的飼料；1/2 野生型+ 1/2 轉基因藻類：餵食包覆 1/2 野生型和 1/2VP28 轉殖藻的飼料；野生型：餵食包覆野生藻的飼料。正控制組、轉基因藻類、野生型和 1/2 野生型+ 1/2 轉基因藻類：注射白點病毒液。負控制組：注射 PBS 液。其結果如圖 8 所示。

表 2. 餵食野生型與含有黃鰭鯛生長激素基因的轉殖擬球藻在透過豐年蝦餵食紅色吳郭魚後的生長狀況比較

培養時間 (小時)	餵食的豐年蝦	平均體重 (g)		增加重量 (%)	平均體長 (cm)		增加體長 (%)	條件因子
		最初	最終		最初	最終		
4	野生型	0.23±0.0 1 ^a	0.43±0.0 7 ^a	87±3.2 ^a	1.36±0.0 1 ^a	3.27±0.1 0 ^a	139±4.2 ^a	12.0±0.0 1 ^a
	轉基因	0.23±0.0 1 ^a	0.77±0.0 9 ^b	232±7.1 ^b	1.36±0.0 1 ^a	3.98±0.1 7 ^b	197±7.5 ^b	12.1±0.0 2 ^a
6	野生型	0.23±0.0 1 ^a	0.47±0.0 6 ^c	104±4.1 ^c	1.36±0.0 1 ^a	3.35±0.1 3 ^c	146±5.5 ^c	12.2±0.0 2 ^a
	轉基因	0.23±0.0 1 ^a	0.98±0.1 4 ^d	316±9.7 ^d	1.36±0.0 1 ^a	4.38±0.2 3 ^d	217±8.9 ^d	12.0±0.0 1 ^a

*數據以平均值±SD 表示

*每組 n=20 隻紅色吳郭魚苗

*同一行中之平均值以同一英文字母標示者，表示無顯著差異(p<0.05)

*100 mL 之 *N. oculata* (1 X 10⁵ 個細胞)

將野生型與含有黃鰭鯛生長激素基因的轉殖擬球藻透過豐年蝦飼食紅色吳郭魚，並記錄紅色吳郭魚之生長狀況，結果顯示飼食含有黃鰭鯛生長激素基因的轉殖擬球藻能幫助紅色吳郭魚快速的成長，體重增加速率比飼食野生種擬球藻的組別高兩到三倍，體長增加也將近兩倍（表 2）。此一結果顯示轉殖擬球藻所生產的魚類生長因子能具有生物活性。

【圖式簡單說明】

圖 1 顯示表現載體 phr-LFB-Red，其用以使藻類產生融合紅螢光蛋白（RFP（DsRed））之重組牛乳鐵蛋白（bovine lactoferricin；LFB）。*Hsp70A+RBCS 2: Chlamydomonas reinhardtii* 的熱休克蛋白 70A 基因之啟動子與 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小次體 2 基因（ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit 2 gene）之啟動子的融合。rLFB：重組藻類密碼子最佳化的（algae-codon-optimized）LFB。DsRed：珊瑚（*Discosoma* sp.）（Clontech）之紅色螢光蛋白基因。箭頭指示以胃蛋白酶作用後所釋放出之功能性區域的位置。*NheI* 及 *EcoRV* 為在 pCB740 載體中插入編碼融合蛋白（LFB-DsRed）之 DAN 片段之切點。DF 及 DR 為用以篩選含有 phr-rLFB-Red 之藻類轉殖株的引子，預期會放大產生一 450-bp 的 PCR 產物。

圖 2 顯示利用合成胃液進行擬球藻前處理之效果。兩旁的數字表示擬球藻經合成胃液處理的時間。

圖 3 顯示利用 PCR 方式檢測經不同條件處理後的擬球藻（第一代）的體染色體中是否含有轉殖基因。M：分子量標的。N：不含模板之負控制組。P：含 1ng 轉殖基因之正控制組。W：野生種擬球藻之體染色體。1~11：經基因轉殖處理之擬球藻體染色體。(A)：以 1kV 進行電穿孔。(B)：以 2kV 進行電穿孔。

圖 4 顯示 (A)：將轉殖擬球藻於洋菜培養基上培養六十天後，在轉殖藻株中有兩株(0829A 及 0829B)能在藻落周圍產生橙色圓環。(B) 野生型或轉殖不穩定的藻株，其周圍沒有橙色圓環。(C)：周圍沒有橙色圓環的藻株，在螢光顯微鏡下也不會產生紅螢光。(D)：周圍有橙色圓環的藻株。(E)：周圍有橙色圓環的藻株能在螢光顯微鏡下觀察到紅螢光產生。

圖 5 顯示利用 RT-PCR 檢測經熱誘導處理後的擬球藻體是否能轉錄外源性基因。M：分子量標的。N：不含模板之控制組。P：含 1ng 轉殖基因之正控制組。W：野生種擬球藻之體染色體。1~4：經基因轉殖處理之擬球藻體染色體。LF-LR：可放大出轉殖基因編碼區之引子組，可得知外源性基因是否有在轉殖擬球藻中進行轉錄。PF-LR：可放大出轉殖基因之啟動子與編碼區之引子組，能檢視實驗是否有遭到轉殖基因質體之 DNA 污染。

圖 6 顯示利用 SDS-PAGE 分析轉殖擬球藻在熱誘導處理前後的總蛋白質，並配合適當的抗體進行西方點墨法檢測。(A)：取 50 毫升濃度為 1×10^7 cell/ml 的擬球藻以 SDS-PAGE (12%) 進行擬球藻蛋白質分析。M：分子量標的。W：野生種擬球藻之總可溶性蛋白質。T：轉殖藻之總可溶性蛋白質。熱休克：於 42°C 持續光照情況下培養 16 小時。(B)：以適當的一次抗體偵測轉殖擬球藻是否能表現外源性蛋白，箭頭所指的位置是被抗體標示的外源性蛋白。

圖 7 顯示以溶菌環試驗檢視轉殖抗菌肽的轉殖擬球藻經過消化後，其抗菌活性。

圖 8 顯示口服疫苗感染試驗中，注射白點病毒後的天數與草蝦死亡率關係圖。注射後天數：白點病毒注射後天數；累積死亡率 (%)：草蝦累積死亡率。在線旁邊標記有星號圖示的是和正控制組有顯著差異的組別。攻擊劑量 (Challenge dose) = LD90。

附件 1 為圖 2 的彩色示意圖。

附件 2 為圖 4 的彩色示意圖。

【序列表】

<110> 國立台灣大學

<120> 使擬球藻成為生物反應器之基因轉殖技術

<130> 0745-NTU-TW

<160> 14

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 520

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> *Chlamydomonase reinhardtii* 的熱休克蛋白 70A 基因之啟動子與 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小次體 2 基因之啟動子的融合基因

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(520)

<400> 1

cggcggggag ctcgctgagg cttgacatga ttggtgcgta tgtttgtatg aagctacagg 60

201024414

actgatttg cgggctatga gggcgcgga agctctggaa gggccgcat gggcgcgcg 120
gcgtccagaa ggcgccatac ggcccgtgg cggcacccat ccggtataaa agcccgcgac 180
cccgaacggt gacctccact ttcagcgaca aacgagcact tatacatag cgactattct 240
gccgtatac ataaccactc agctagctta agatcccatc aagcttgcac gccgggcgcg 300
ccagaaggag cgcagccaaa ccaggatgat gttgatggg gtattgagc acttgcaacc 360
cttatccgga agccccctgg ccacaaaagg ctaggcgcca atgcaagcag ttccgatgca 420
gcccctggag cggtgccctc ctgataaacc ggccaggggg cctatgttct ttactttttt 480
acaagagaag tcaactcaaca tcttaaaatg gccaggtgag 520

<210> 2

<211> 775

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 可表現紅螢光(DsRed)與牛乳鐵蛋白(LFB)之 cDNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(775)

<400> 2

gctagcaccg gtcgccacca tgttcaaag tcgtcgttgg caatggcgta tgaaaaaatt 60

agggtgctcct tctattacat ggttacgtcg tgctttcatg gcctcctccg agaacgtcat 120

caccgagttc atgcgcttca aggtgcgcat ggagggcacc gtgaacggcc acgagttcga 180

gatcgagggc gagggcgagg gccgccccta cgagggccac aacaccgtga agctgaaggt 240

gaccaagggc ggccccctgc ccttcgctg ggacatcctg tccccccagt tccagtacgg 300

ctccaaggtg tacgtgaagc accccgccga catccccgac tacaagaagc tgccttccc 360

cgagggcttc aagtgggagc gcgtgatgaa cttcgaggac ggcgggcgtg cgaccgtgac 420

ccaggactcc tccctgcagg acggctgctt catctacaag gtgaagtcca tcggcgtgaa 480

cttcccctcc gacggccccg tgatgcagaa gaagaccatg ggctgggagg cctccaccga 540

gcgcctgtac ccccgcgacg gcgtgctgaa gggcgagacc cacaaggccc tgaagctgaa 600

ggacggcggc cactacctgg tggagttcaa gtccatctac atggccaaga agcccgtgca 660

gctgcccggc tactactacg tggacgcaa gctggacatc acctcccaca acgaggacta 720

caccatcgtg gagcagtacg agcgcaccga gggccgccac cacctgttcc tgtag 775

201024414

<210> 3

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 藻類密碼子最佳化後的 LFB cDNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(78)

<400> 3

atgttcaaat gtcgtcgttg gcaatggcgt atgaaaaaat taggtgctcc ttctattaca 60

tgtgtacgtc gtgctttc 78

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 前置引子

<220>

201024414

<221> misc_binding

<222> (1)..(49)

<400> 4

gctagcaccg gtcgccacca tgttcaaagc tcgtcgttgg caatggcgt

49

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 前置引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(39)

<400> 5

gcaatggcgt atgaaaaaat taggtgctcc ttctattac

39

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

201024414

<220>

<223> PCR 前置引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(39)

<400> 6

cttctattac atgtgtacgt cgtgcittca tggcctcct

39

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 反置引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(33)

<400> 7

atttgtgatg ctattgcttt atttgaacc att

33

201024414

<210> 8

<211> 615

<212> DNA

<213> 白點病病毒 (white spot syndrome baculovirus)

<220>

<221> 基因

<222> (1)..(615)

<400> 8

atggatcttt ctttcaactct ttcggtcgtg tcggccatcc tcgccatcac tgctgtgatt 60

gctgtattta ttgtgatttt taggtatcac aacactgtga ccaagaccat cgaaaccac 120

acagacaata tcgagacaaa catggatgaa aacctccgca ttctgtgac tgctgaggtt 180

ggatcaggct acttcaagat gactgatgtg tcctttgaca gcgacacctt gggcaaaatc 240

aagatccgca atggaaagtc tgatgcacag atgaaggaag aagatgcgga tcttgtcatc 300

actcccgtgg agggccgagc actcgaagtg actgtggggc agaatctcac ctttgagggg 360

acattcaagg tgtggaacaa cacatcaaga aagatcaaca tcactggtat gcagatggtg 420

ccaaagatta acccatcaaa ggcctttgtc ggtagctcca acacctctc cttcaccccc 480

gtctctattg atgaggatga agttggcacc tttgtgtgtg gtaccacctt tggcgcacca 540

201024414

attgcagcta cgcggtgg aatctttc gacatgtacg tgcacgtcac ctactctggc 600

actgagaccg agtaa 615

<210> 9

<211> 615

<212> DNA

<213> 黃鰭鯛 (Acanthopagrus latus)

<220>

<221> 基因

<222> (1)..(615)

<400> 9

atggacagag tgggtctcat gctgtcgggtg ctgtctctgg gcgtctcctc tcagccgatc 60

acagacggcc agcgtctggt ctccatcgtt gtcagcagag ttcaaacct ccacctgctc 120

gctcagagac tcttctctga ctttgagagc tctctgcaga ctgaggagca acgacagctc 180

aacaaaatct tcctgcagga tttctgtaac tctgattaca tcatcagccc catcgacaag 240

cacgagacac agcgcagctc agtgttgaag ctgctgtcta tctcctatcg attggtcgag 300

tcttgggagt tccccagtcg tttctctggct ggcggttctg ctccaaggaa ccagatttca 360

cccaaactgt ctgagctgaa gacaggcatc catctcctga tcagggccaa tgaggatgga 420

201024414

gcagagctct tccctgatag ctccgccctc cagctggctc cttatggaga ctactaccaa 480

agtccgggca cgcacgagtc gctgagacga acctacgaac tacttgctg tttcaaaaaa 540

gacatgcaca aggtggagac ctacctgaca gtggcaaaat gtagactctc tccagaggcc 600

aactgcaccc tgtag 615

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 轉殖基因的專一性引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(26)

<400> 10

cctcctccga gaacgtcatc accgag 26

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 轉殖基因的專一性引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(21)

<400> 11

cctcgggtgcg ctcgtactgc t

21

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 可偵測內生性 18S rRNA 基因的引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(26)

<400> 12

gcggaggaaa agaactaacc aggatt

26

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 可偵測內生性 18S rRNA 基因的引子

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(19)

<400> 13

aacgccatgg cacaaccgc

19

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡聚脫氧胸苷酸 (Oligo dT) 引子

201024414

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)..(18)

<400> 14

tttttttttt tttttttt

18

五、中文發明摘要：

本發明提供一種可在藻類中表現之核酸，其係由編碼 SEQ ID NO：3 所示之核苷酸序列所組成，其中該核苷酸可於藻類中轉譯出牛乳鐵蛋白 (LFB)。本發明亦提供一種經蛋白分解酵素液削弱或移除細胞壁的藻類以及在該藻類中產生所欲外源性基因產物的方法。本發明另提供一種用於餵食水生生物的組合物，其包含如上述經蛋白分解酵素液削弱或移除細胞壁的藻類或其子代。

六、英文發明摘要：

The present invention provides a nucleic acid consisting of the nucleotides of SEQ ID NO：3, wherein the nucleotide can be translated to bovine lactoferricin (LFB) in algae. The present invention also provides treated algae with cell wall digested by protein enzyme solution and a method of producing desired foreign gene products in the algae. The present invention further provides a composition for use in feeding aquatic organisms, comprising the treated algae described above or their filial generations.

十、申請專利範圍：

1. 一種可在藻類中表現之核酸，其係由編碼 SEQ ID NO：3 所示之核苷酸序列所組成，其中該核苷酸可於藻類中轉譯出牛乳鐵蛋白 (LFB)。
2. 如申請專利範圍第 1 項之核酸，其另可與編碼螢光蛋白之序列做操作性連接，轉譯出牛乳鐵蛋白與螢光蛋白的融合蛋白。
3. 如申請專利範圍第 2 項之核酸，其中螢光蛋白係紅螢光蛋白 (DsRed)，連接後可產生包含編碼如 SEQ ID NO：2 所示之核苷酸序列，該序列可轉譯出牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白 (LFB-DsRed)。
4. 如申請專利範圍第 3 項之核酸，其中 LFB 與 DsRed 的接合處包含一胃蛋白酶裁切位置。
5. 如申請專利範圍第 2 項之核酸，其中螢光蛋白係作為篩選藻株之標記，會在成功轉殖之藻株中發出螢光。
6. 如申請專利範圍第 2 項之核酸，其另可操作性連接上一啟動子，該啟動子係編碼如 SEQ ID NO：1 所示之核苷酸序列。
7. 如申請專利範圍第 1 項之核酸，其中藻類係單細胞藻類。
8. 如申請專利範圍第 7 項之核酸，其中藻類係選自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Cheatoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻

- (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。
9. 如申請專利範圍第 8 項之核酸，其中藻類係擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*)。
 10. 一種在藻類中產生外源性基因產物的方法，其包含步驟如下：
 - a. 使用蛋白分解酵素液削弱或移除藻類細胞壁，使其適合進行基因轉殖；
 - b. 將編碼外源性基因產物之基因轉殖入藻類中；及
 - c. 表現外源性基因得到外源性基因產物。
 11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中蛋白分解酵素液係包含可分解蛋白質的酵素及可活化該酵素的環境溶液。
 12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中蛋白分解酵素液係包含鹽酸、氯化鉀、及胃蛋白酶 A 的合成胃液。
 13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中合成胃液係包含 150 mM 鹽酸、15 mM 氯化鉀、及 5% 胃蛋白酶 A。
 14. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該外源性基因係來自細菌、真菌、病毒、植物或動物。
 15. 如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該外源性基因係包含牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白 (LFB-DsRed) 基因、草蝦白點病病毒表面蛋白 (VP28) 基因、或黃鰭鯛生長激素 (rYGH) 基因。
 16. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中藻類係以 f/2 培養基，培養於光源

為白色日光燈的 27°C 恆溫培養箱，並提供 10 小時光照及 14 小時黑暗的光照週期。

17. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其係使用電穿孔轉殖法將編碼外源性基因產物之基因轉殖入藻類中。
18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中電穿孔轉殖條件係包含電壓值 2000 V/mm、脈衝時間 20 微秒、及脈衝次數 10 次。
19. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中轉殖後之外源性基因產物具有生物活性。
20. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中生物活性係包含抗菌、抗病毒、或增加生長速率。
21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中生物活性係包含可抗腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、可抗白點病病毒 (white spot syndrome baculovirus)、或可增加生長速率 2 到 3 倍。
22. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中藻類係單細胞藻類。
23. 如申請專利範圍第 22 項之方法，其中藻類係選自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Ceratoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻

(*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。

24. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中藻類係擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*)。
25. 一種基因轉殖藻類，其細胞壁係使用蛋白分解酵素液來削弱或移除。
26. 如申請專利範圍第 25 項之藻類，其中蛋白分解酵素液係包含可分解蛋白質的酵素及可活化該酵素的環境溶液。
27. 如申請專利範圍第 26 項之藻類，其中蛋白分解酵素液係包含鹽酸、氯化鉀、及胃蛋白酶 A 的合成胃液。
28. 如申請專利範圍第 27 項之藻類，其中合成胃液係包含 150 mM 鹽酸、15 mM 氯化鉀、及 5% 胃蛋白酶 A。
29. 如申請專利範圍第 25 項之藻類，其包含編碼外源性基因產物之轉殖基因。
30. 如申請專利範圍第 29 項之藻類，其中該外源性基因係來自細菌、真菌、病毒、植物或動物。
31. 如申請專利範圍第 30 項之藻類，其中該外源性基因係包含牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白 (LFB-DsRed) 基因、草蝦白點病病毒表面蛋白 (VP28) 基因、或黃鰭鯛生長激素 (rYGH) 基因。
32. 如申請專利範圍第 29 項之藻類，其中該外源性基因產物可在藻類中表現並具有生物活性。
33. 如申請專利範圍第 32 項之藻類，其中生物活性係包含抗菌、抗病毒、

或增加生長速率。

34. 如申請專利範圍第 33 項之藻類，其中生物活性係包含可抗腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、可抗白點病病毒 (white spot syndrome baculovirus)、或可增加生長速率 2 到 3 倍。
35. 如申請專利範圍第 25 項之藻類，其係單細胞藻類。
36. 如申請專利範圍第 35 項之藻類，其係選自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Cheatoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻 (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。
37. 如申請專利範圍第 36 項之藻類，其係擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*)。
38. 一種飼料組合物，其包含一種基因轉殖藻類或其子代，其中該基因轉殖藻類之細胞壁係使用蛋白分解酵素液來削弱或移除。
39. 如申請專利範圍第 38 項之組合物，其中該蛋白分解酵素液係包含可分解蛋白質的酵素及可活化該酵素的環境溶液。
40. 如申請專利範圍第 39 項之組合物，其中蛋白分解酵素液係包含鹽酸、氯化鉀、及胃蛋白酶 A 的合成胃液。
41. 如申請專利範圍第 40 項之組合物，其中合成胃液係包含 150 mM 鹽酸、

15 mM 氯化鉀、及 5% 胃蛋白酶 A。

42. 如申請專利範圍第 38 項之組合物，其中該基因轉殖藻類係包含編碼外源性基因產物之轉殖基因。
43. 如申請專利範圍第 42 項之組合物，其中該外源性基因係來自細菌、真菌、病毒、植物或動物。
44. 如申請專利範圍第 43 項之組合物，其中該外源性基因係包含牛乳鐵蛋白與紅螢光蛋白的融合蛋白 (LFB-DsRed) 基因、草蝦白點病病毒表面蛋白 (VP28) 基因、或黃鰭鯛生長激素 (rYGH) 基因。
45. 如申請專利範圍第 42 項之組合物，其中該外源性基因產物可在藻類中表現並具有生物活性。
46. 如申請專利範圍第 45 項之組合物，其中生物活性係包含抗菌、抗病毒、或增加生長速率。
47. 如申請專利範圍第 46 項之組合物，其中生物活性係包含可抗腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、可抗白點病病毒 (white spot syndrome baculovirus)、或可增加生長速率 2 到 3 倍。
48. 如申請專利範圍第 38 項之組合物，其中該藻類係單細胞藻類。
49. 如申請專利範圍第 48 項之組合物，其中該藻類係選自海洋或淡水的綠藻 (*Chlorella*)、單胞藻 (*Chlamydomonas*)、團藻 (*Volvox*)、角刺藻 (*Ceratoceros*)、三角褐指藻 (*Phaeodactylum*)、骨條藻 (*Skeletonema*)、羽狀矽藻 (*Navicula*)、菱形藻 (*Nitzschia*)、海鏈藻 (*Thalassiosira*)、雙眉藻 (*Amphora*)、微綠球藻 (*Nannochloris*)、擬球藻

(*Nannochloropsis*)、扁藻 (*Tetraselmis*)、杜氏藻 (*Dunaliella*)、螺旋藻 (*Spirulina*)、微胞藻 (*Microcystis*)、顫藻屬 (*Oscillatoria*)、等鞭金藻 (*Isochrysis*)、巴夫藻 (*Pavlova*)、或橫裂假藻 (*Dinophyceae*)。

50. 如申請專利範圍第 49 項之組合物，其中該藻類係擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*)。
51. 如申請專利範圍第 38 項之組合物，其係用於餵食水生生物。
52. 如申請專利範圍第 51 項之組合物，其中該水生生物係魚或蝦。

十一、圖式：

圖 1

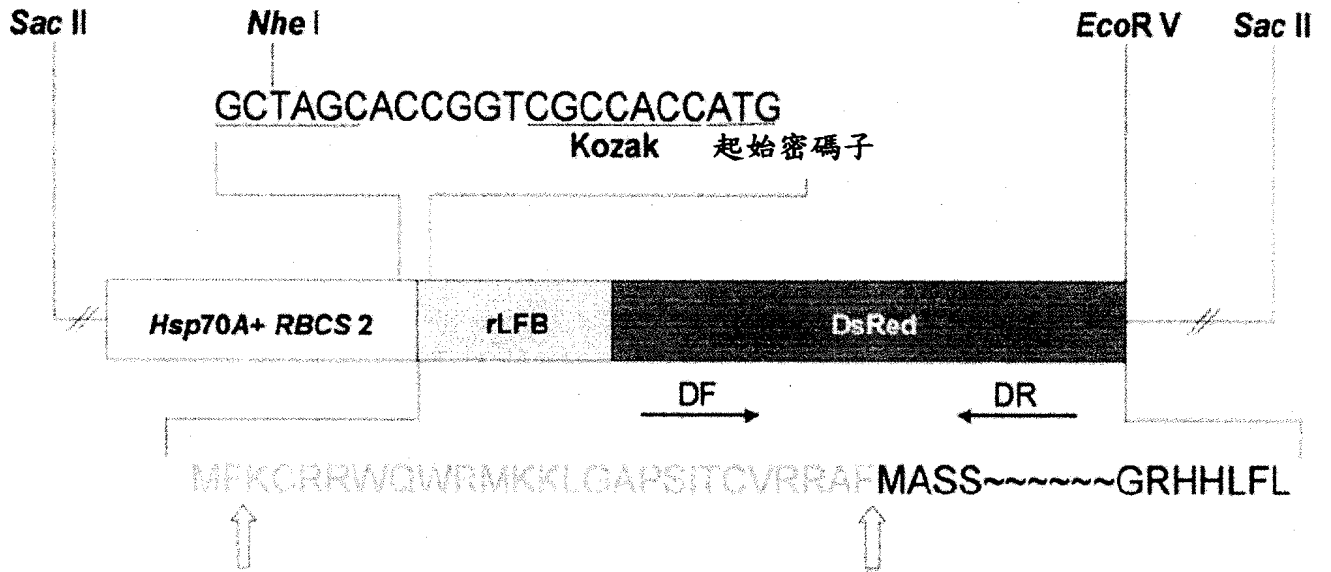


圖 2

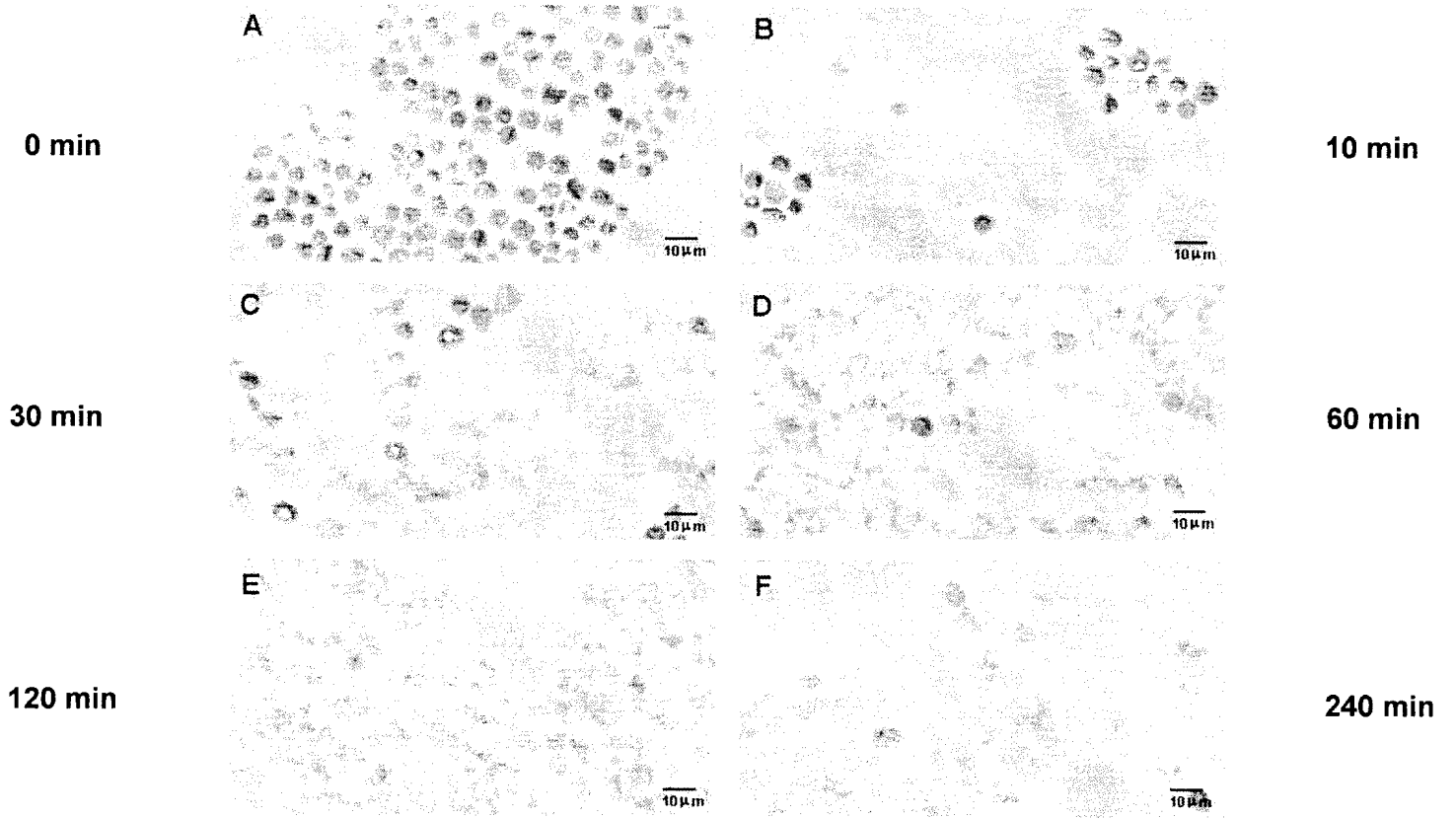


圖 3

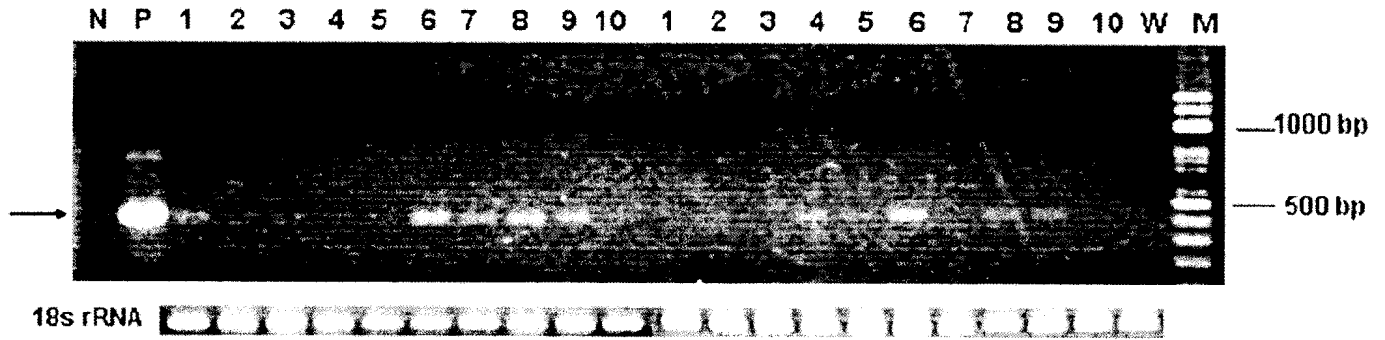
(A)

以 1kV 進行電穿孔

胃蛋白酶作用時間

30 min

60 min



(B)

以 2kV 進行電穿孔

胃蛋白酶作用時間

30 min

60 min

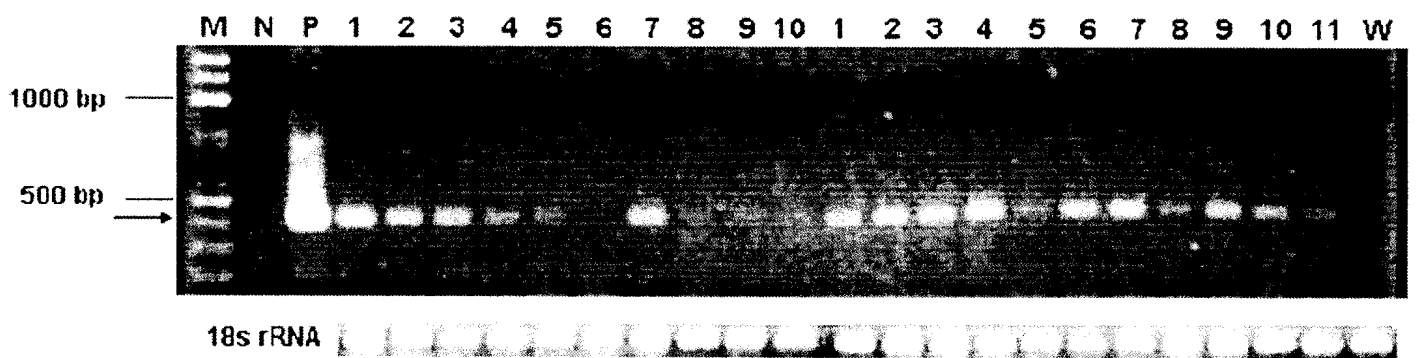


圖 4

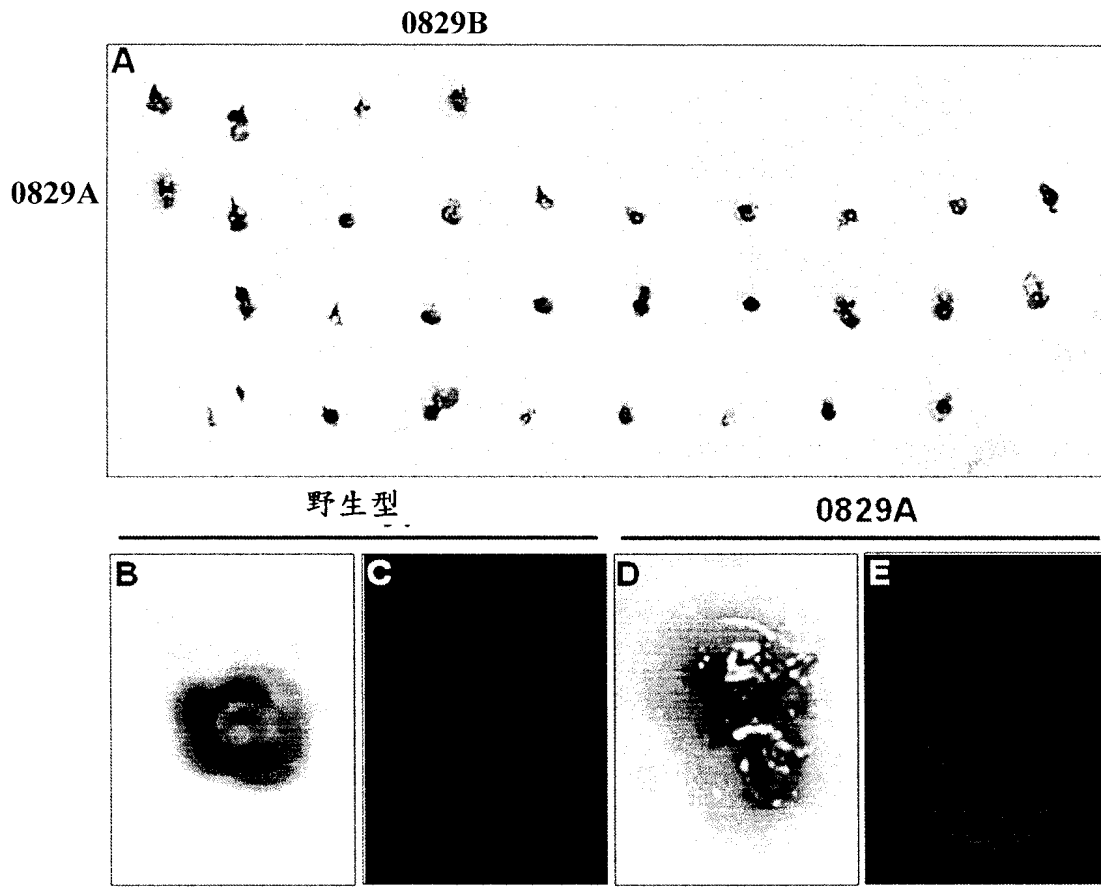


圖 5

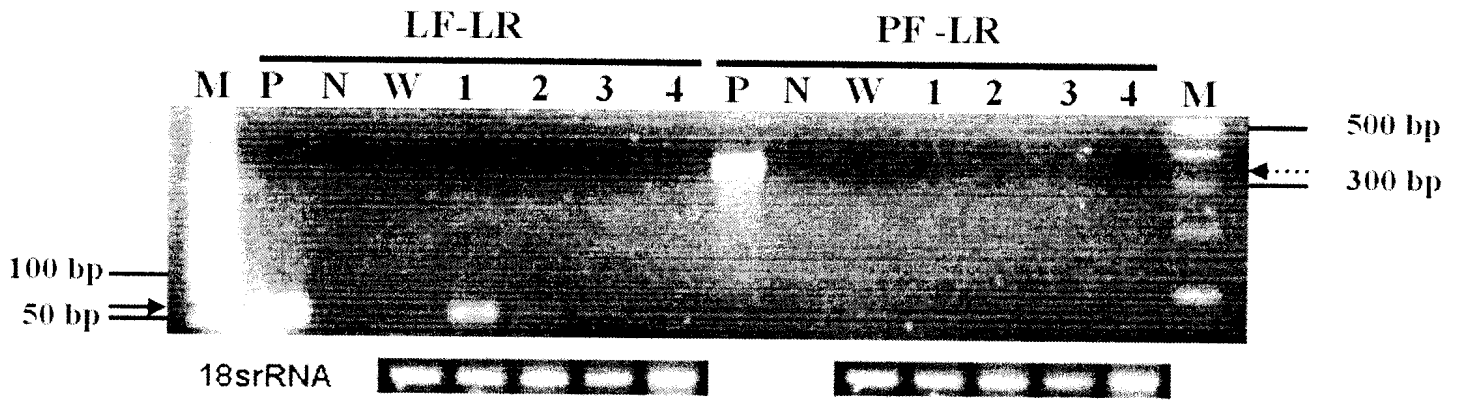


圖 6

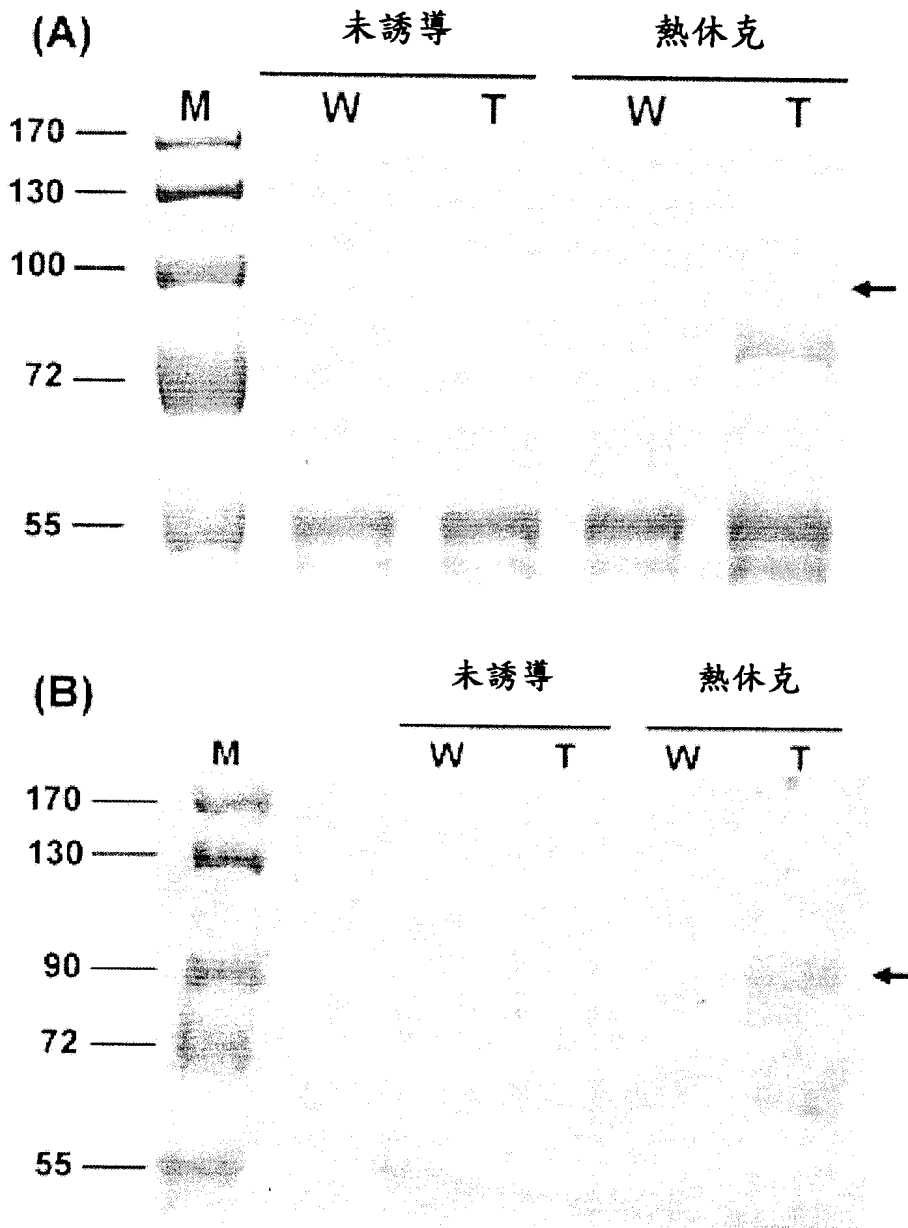


圖 7

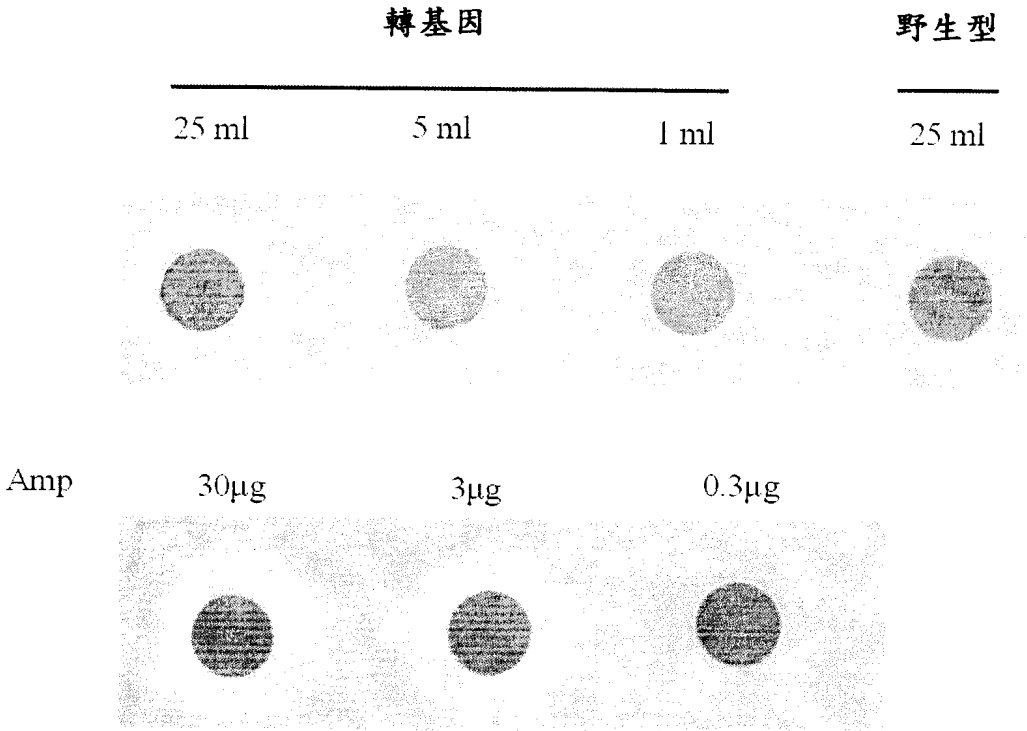
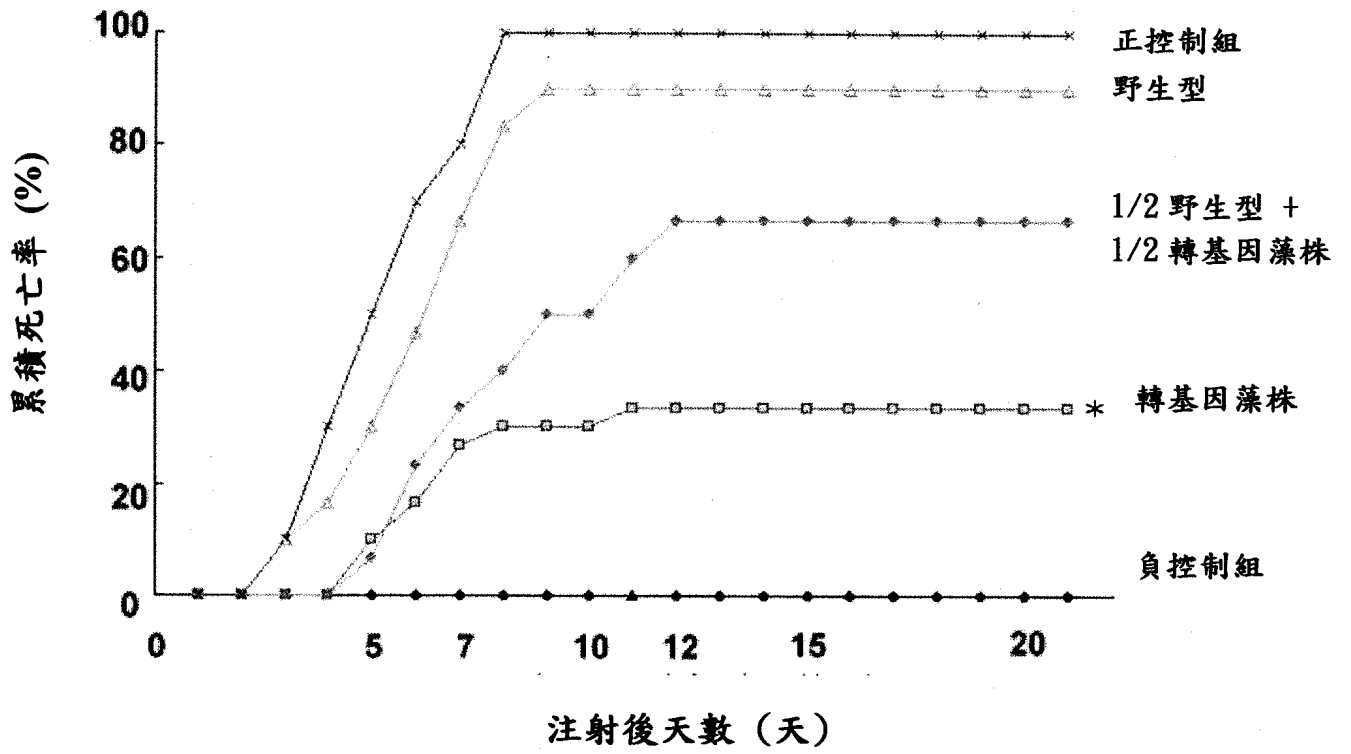
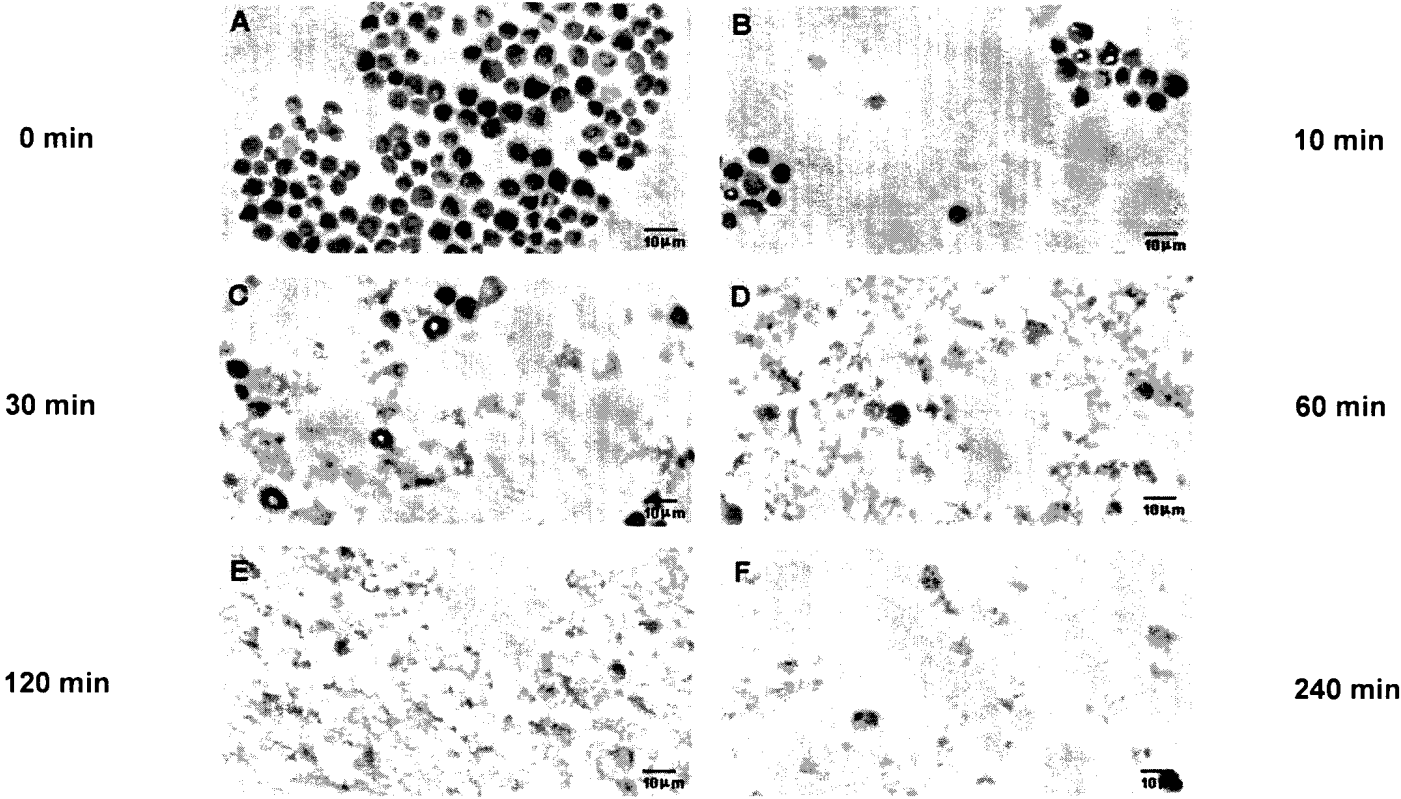


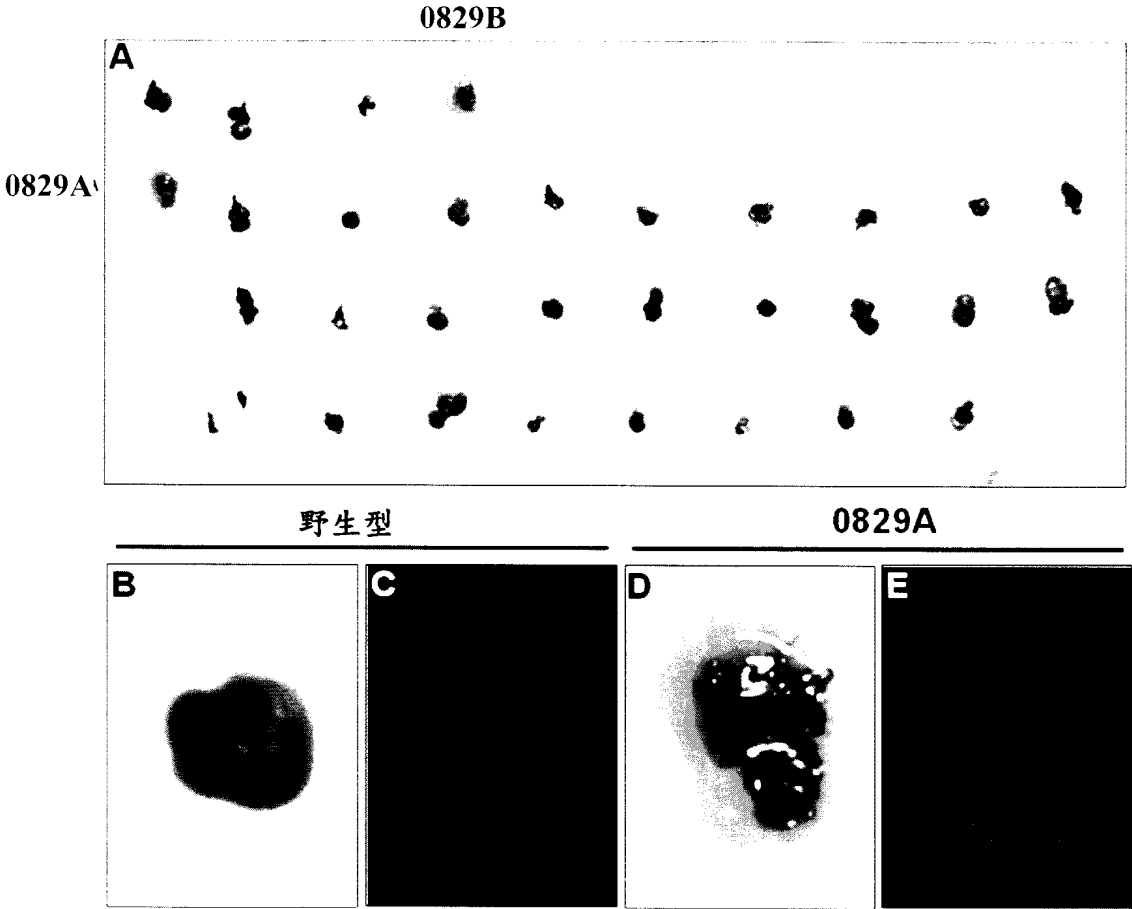
圖 8



附件 1



附件 2



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。