

# 分子生物学技术在水产养殖中的应用\*

## THE APPLICATION OF MOLECULAR BIOLOGICAL TECHNIQUES IN THE AQUACULTURE

欧阳高亮<sup>1</sup> 肖 俐<sup>2</sup> 李祺福<sup>1</sup> 洪水根<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 厦门大学细胞生物学研究室 361005)

(<sup>2</sup> 江西医学院细胞生物学教研室 330006)

分子生物学理论与技术的迅猛发展,是近些年来生命科学最为突出的特征。目前,分子生物学技术在动植物品种改良与鉴定以及人类疾病诊断与治疗等领域中已得到了广泛应用,但在水产养殖中应用还很少。近些年来,许多国家竞相研究和发展与水产养殖有关的分子生物学技术,其中竞争的热点在于开发新的优良养殖种类,通过生殖和遗传操作培育优良高产抗逆的良种以及寻找检测和防治病害的新技术新方法等。因此应用分子生物学技术进行水产养殖品种改良和疾病防治就很有发展潜力。本文拟对分子生物学技术在水产育种、种质鉴定、病原体检测以及疾病防治中的应用现状及其应用前景作一综述。

### 1 分子生物学技术在水产育种与种质鉴定中的应用

#### 1.1 转基因技术

随着分子生物学技术的发展,转基因生物研究已成为生命科学领域的研究热点之一。人们期望通过基因转移技术将外源基因导入某些动植物基因组中,以便达到改良或获得某些重要性状(如生长快、抗逆性强、生产药用蛋白等)的目标。其中转基因动物育种研究进展较快,应用前景令人瞩目。转基因动物技术突破了传统有性杂交的局限性和盲目性,克服了物种之间的生殖隔离,实现了物种之间遗传物质的交换和重组,不仅为遗传物质的研究提供了新的手段,也丰富了物种的基因库,并为该技术的实际应用奠定了基础。自1982年Palmiter等获得转基因小鼠以来,目前人们已获得了转基因大鼠、兔、绵羊、猪、山羊、牛、鱼和鸡等转基因动物。

近些年来,转基因育种技术已广泛应用于培育具

有优良性状的转基因水产养殖新品种。目前利用转基因技术获得的水产养殖动植物主要有转基因鱼、转基因藻,另外还有转基因虾、贝等。

1.1.1 转基因鱼 自1985年朱作言等在上世界上首次报道在鱼类中进行转基因研究以来,世界上已有许多实验室相继开展了这一领域的工作。其中常用于鱼类基因转移的基因为生长激素基因,用于转基因的鱼有金鱼、鲤鱼、虹鳟等几十种鱼。人们希望用鱼类和哺乳动物的生长激素基因向鱼类转移以期获得有实用价值的个体大、生长迅速的“超级鱼”。目前已有不少实验室获得了多种能快速生长的转生长激素基因鱼,如Du等1992年将生长激素基因转入大西洋鲑,获得的转基因个体的重量比对照组平均大3.8倍,生长速度比对照组快4~6倍。

除生长激素基因外,抗冻蛋白基因也是鱼类基因转移中常用目的基因之一。如于建康等1994年通过精子载体,成功地将抗冻蛋白基因转入金鱼,获得26%的转化率。Tasi等1995年使用电激法将外源抗寒和生长激素基因导入泥鳅精子再与卵进行受精,从而提高了基因转移的效率。

另外,金属硫蛋白基因、溶菌酶基因、干扰素基因和球蛋白基因等与鱼类抗病抗逆性有关的基因也是目前转基因鱼研究中常选用的靶基因。

1.1.2 转基因藻 藻类是光合自养的低等植物,分布非常广泛,是海洋生态系和人工养殖生态系的能量和物质基础,同时也是海洋药物、功能食品和精细化工产品的重要原料。

\* 福建省自然科学基金资助项目 C97015 号。

收稿日期:1999-03-22;修回日期:1999-07-15

目前组织培养、原生质体融合等传统生物技术已广泛应用于藻类研究,但应用分子生物学技术有目的地利用和定向改造藻类生物体系的研究则是近些年才得以开展。近几年来,从分子水平研究藻类个体发育与系统发育遗传机制的藻类分子遗传学研究发展较为迅速,并在此基础上,应用重组 DNA 技术人工构建藻类新品种以及实现藻类天然产物的基因工程生产的藻类基因工程研究也取得重要进展。近些年来,我国学者围绕构建藻类反应器表达生产蛋白和药物的目标,开展了较有特色的藻类基因、载体和表达系统的研究,并在转基因海带、鱼腥藻基因工程以及紫菜基因工程等藻类基因工程领域取得较大进展<sup>[1-2]</sup>。

目前用于藻类基因工程的目的基因主要有 *desA*, *acc1*, *apcAB*, 金属硫蛋白基因和超氧化物歧化酶基因等,用于基因转移的藻类表达系统主要有蓝藻、螺旋藻、海带、裙带菜、紫菜和江蓠等藻类。

### 1.2 RFLP 技术

限制性酶切片段长度多态性(RFLP)指的是用限制性内切酶切割不同个体基因组 DNA 后,含同源序列的酶切片段在长度上的差异。这种差异可以在电泳图谱上筛选并显示出来,并按孟德尔遗传定律分离。

目前,RFLP 技术已与 PCR 等技术联用,发展已相当成熟,在一些经济动植物多基因数量性状的基因定位等方面的研究与应用已取得重要进展,但在水产养殖业则刚刚起步。如有人将虹鳟线粒体 DNA 的 RFLP 标记用于遗传分析,为种质鉴定和遗传育种提供依据。

### 1.3 RAPD 技术

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术是在 PCR 技术基础上发展起来的一项 DNA 多态性检测技术,其基本原理是利用一系列不同的碱基顺序随机排列的寡聚核苷酸单链(常为十聚体)为引物,对所研究的 DNA 模板基因组进行 PCR 扩增,通过对 PCR 产物的检测即可对基因组 DNA 的多态性进行检测。

RAPD 技术可以在对物种没有任何分子生物学研究背景的情况下,对其 DNA 进行多态性分析。而且与 RFLP、DNA 指纹图谱法等其他 DNA 多态性检测技术相比,RAPD 技术具有检测效率高、样品用量少、灵敏度高等特点,因此广泛应用于农作物和畜禽品种及品系的鉴定、物种亲缘关系的确定、基因定位和分离以及构建基因图谱等方面的研究。

目前 RAPD 技术也已用于水产品群体遗传差异分析,如用于高首鲟 (*Acipenser transmontanus* Richardson) 减数分裂雌核发育和多倍体的快速鉴定、对草鱼和鲤鱼的群体遗传变异进行研究、对甲壳动物遗传差异进行分析和对银鲫复合种外源遗传物质整入进行 RAPD 检测<sup>[3-5,7]</sup>。

### 1.4 DNA 指纹技术

DNA 指纹技术是分子生物学新兴技术之一。其基本依据是存在于基因组内的高度变异的重复序列微卫星 DNA 可与众多的基因组酶切片段进行杂交,得到具有个体特异性的指纹图谱。这种 DNA 指纹图谱具有高度种属和个体特异性,可以用于寻找遗传标记,进行遗传连锁分析;也可用于测定物种之间的遗传距离以及品种遗传纯度。因此可利用该技术测定物种的遗传距离,然后选用合适的亲本进行杂交,以便提高杂种优势,获得产量高、生长迅速的新品种。据 Herbing 等 1995 年、Carter 等 1991 年、Gross 等 1994 年报道,目前 DNA 指纹技术已应用于水产养殖中,如用于分析虹鳟的父本和母本对子代生长存活的影响、对雌核生殖罗非鱼和小口黑鲈的不同群体进行鉴别。

## 2 分子生物学技术在水产养殖病原体检测中的应用

目前,我国水产养殖业尤其是虾类、贝类和鱼类养殖业受到病原微生物的严重影响,因此如何快速准确预报和诊断水产动植物疾病,就成为当前水产养殖业十分重要而突出的问题。近些年来,分子生物学技术的迅速发展,已经有可能为水产养殖病原体的检测提供快速有效而且特异性强灵敏度高的技术手段<sup>[6]</sup>。

### 2.1 单克隆抗体技术

单克隆抗体技术是 Kohler 和 Milstein 于 1975 年发展起来的利用杂交瘤细胞制备大量针对某一抗原决定簇的特异性抗体的技术。单克隆抗体与常规血清抗体相比,特异性强,能识别单一抗原决定簇,且容易制备,能通过保持细胞系重复获得相同抗体,因而在水产养殖病原体检测中得到广泛应用。如应用于诊断海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 的鳃立克次体、诊断与鱼类及牡蛎相结合的淋巴细胞病毒、检测菲律宾蛤仔

棕环病病因弧菌 P1。另外,近年来已有人利用此技术制备了抗鳃弧菌的单克隆抗体和抗嗜水气单胞菌外毒素的单克隆抗体。据陈琼等 1996 年报道,利用该技术制备的单克隆抗体可用于提纯嗜水气单胞菌 hec 毒素。

## 2.2 酶联免疫吸附检测

酶联免疫吸附检测(ELISA)是将抗原或抗体吸附在固相载体表面,使抗原抗体反应在固相载体表面进行的一种检测技术。该技术将抗原抗体反应的特异性与酶对底物的高效催化作用有机地结合起来,通过酶作用于底物后呈现的颜色变化来显示抗原抗体特异反应的存在,因此特异性强,灵敏度高,反应快速,结果可以定量,也可对抗原、抗体以及抗原抗体复合物进行定位分析。

目前 ELISA 法在水产养殖病原体诊断尤其在鱼病学诊断上应用较广。国内如钱冬等 1993 年用该法检测细菌性败血症病原——嗜水气单胞菌,陈怀青等 1993 年应用 Dot-ELISA 法检测鱼类致病性嗜水气单胞菌 hec 毒素,黄 等 1995 年利用单克隆抗体酶联免疫技术检测对虾皮下造血组织坏死病病毒,李焕荣等 1997 年应用 Dot-ELISA 法快速检测嗜水气单胞菌的致病因子胞外蛋白酶 Ah ECPase54,均取得较为满意的效果。国外则较早用 ELISA 法对疔疮病、红嘴病、细菌性肾脏病和爱德华氏菌病等鱼类疾病进行快速诊断。另外, Noel 等<sup>[8]</sup>利用该法鉴定导致菲律宾蛤仔患棕环病的弧菌 P1。

## 2.3 核酸杂交技术

核酸杂交技术是利用特定标记的 DNA 或 RNA 探针和病原体生物中的与探针互补的靶核苷酸序列进行杂交,以此来确定宿主是否携带有病原体的一类分子生物学技术,可分为 Southern 杂交、Northern 杂交和核酸原位杂交。该技术以其灵敏度高、特异性强和检验快速等优点,近年来在对虾病毒等水产养殖病原体检测中倍受青睐。如 Futo 等、Hiney 等 1992 年将此技术用来诊断细菌性鱼病,Comps 等 1996 年应用地高辛标记的 RNA 探针检测 FEV 病毒在海洋鱼类中的表达, Bruce 等 1994 年利用地高辛标记的 DNA 探针检测对虾杆状病毒。日本也有人利用地高辛标记的 DNA 探针进行菌落杂交用于鳃弧菌的鉴定;利用经 PCR 合成的探针与神经坏死病病毒 DNA 进行杂交选择亲鱼,可有效防止病毒性神经坏死症(VNN)的垂直感

染。我国的研究人员针对 1993 年以来导致我国养殖对虾大规模死亡的病原——皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)已研制出相应的核酸探针,用于检测受该病毒感染的对虾。

## 2.4 PCR 技术

聚合酶链式反应(PCR)是体外酶促合成迅速扩增特异 DNA 片段的一种方法。这项分子生物学技术产生虽仅数年,却以惊人的速度广泛地应用于分子生物学各个领域。目前 PCR 技术已用于水产养殖病原体检测的实际操作,如 Chang 等 1993 年利用 PCR 技术首次成功地进行对虾病毒的扩增, Wang 等 1996 年用 PCR 方法检测对虾杆状病毒,并获得了预计的扩增产物。另外,也有人应用 PCR 技术检测贝类肠道病毒以及水或水生生物体内富集的病毒和细菌。

除应用于病原体检测外,PCR 技术还与其他分子生物学技术联用,广泛应用于水产养殖业其他诸多领域。如应用于鱼类生长激素基因、各种 cDNA 分子的克隆;应用于检测外源基因是否整合入转基因鱼基因组中;应用于制作多基因家族基因组探针以及鱼类种群结构的遗传分析和种质遗传鉴定等。

## 2.5 细胞培养

动物细胞培养技术曾是一门自成体系的现代生物技术。近年来随着已建成的数千种动物细胞系(株)被广泛应用于分子生物学研究,细胞培养技术已纳入分子生物学技术体系。

水产动物细胞培养的研究,最早起始于鱼类,如 Wolf 等 1962 年首次建立了虹鳟生殖腺 RTG2 细胞系。同时也以鱼类细胞培养研究开展得较为系统,已建立的鱼类细胞系也较多。其中我国已建立的部分鱼类细胞系如张念慈等 1981 年建立的草鱼吻端组织二倍体 ZC7901 细胞系,陈敏容等 1985 年建立的鲫鱼异倍体细胞系 CAB80,左文功等 1986 年建立的草鱼肾组织 CIK 细胞系,童裳亮等 1989 年建立的虹鳟巨噬细胞系。与鱼类相比,贝类、虾类等水产动物的细胞培养研究国内外报道较少,如 Hanson 等 1976 年建立了淡水蜗牛胚胎细胞系,徐亚立等最近建立了斑节对虾 PMO 细胞系。

目前,动物细胞培养技术已应用于水产动物病原体检测,如 Lu 等 1995 年应用对虾淋巴器官原代培养细胞检测对虾黄头杆状病毒(YBV)。另外,水产动物细胞培养技术也可用于筛选抗癌药物、培育新品种以

及生产疫苗和药物。

### 3 分子生物学技术在水产养殖疾病防治中的应用

鱼、虾、贝疾病严重威胁着水产养殖业的发展。目前,人们用来对付细菌性疾病的主要手段仍然是使用抗生素,但细菌适应性很强,较易产生抗药性,而且抗生素对病毒性疾病无能为力,因此除了要加强病原体检测之外,更重要的是要培育抗病抗逆性强的水产养殖品种以及开发新的疾病防治技术。近些年的实践表明,分子生物学技术在这些应用领域大有潜力可挖,如利用重组 DNA 技术导入抗病抗逆性基因以获得抗病抗逆性强的转基因水产动植物,另外也可将基因工程疫苗和反义技术应用于水产养殖疾病防治。

#### 3.1 基因工程疫苗

利用基因工程技术可将从细菌或病毒中分离出的具有免疫保护性的抗原基因与载体接合,然后将此重组 DNA 转入大肠杆菌或酵母菌等体外表达系统中,从而大量生产作为疫苗用的抗原蛋白质。这种基因工程疫苗与常规疫苗相比,具有抗原专一、可应用发酵技术进行大量生产等优点。

目前,许多国家已经制备出了基因工程疫苗,并在实际中应用。在水产养殖方面,欧、美、日本等已成功地将弧菌、产气单胞菌、爱德华氏菌等鱼类病原菌制备成全细胞灭活疫苗,并且用从菌体中提取的脂多糖、胞外蛋白等有效抗原,制备出了单克隆抗体等生物工程疫苗并已商业化生产。如 Gil more 等 1988 年将从传染性造血组织坏死病毒中分离到的糖蛋白基因 G 的 Sau3AI 片段转入埃氏大肠杆菌中,得到一种具有较强免疫原性的糖蛋白抗原,该基因工程疫苗能有效防治传染性败血症的感染。

#### 3.2 反义技术

反义技术是近十多年来发展起来的反义核酸技术和核酶技术的总称,可以用来特异性地阻断病毒功能的发挥。反义核酸技术可分为反义 RNA 技术和反义 DNA 技术,但一般常指反义 RNA 技术。反义 RNA 是以 DNA 有义链为模板合成的 RNA 及其衍生物,它

可通过与相应的 mRNA 互补结合而阻断其功能。目前,使用人工合成的反义 RNA 已在原核细胞和真核细胞中成功地抑制了多种病毒基因的表达。

核酶则是一种具有催化作用的 RNA,它通过碱基配对与靶 RNA 相互识别、结合并催化水解靶 RNA,因此它既有反义 RNA 的作用,又能以序列特异性地切割靶 RNA。现已有不少研究显示核酶可用于对病毒靶 RNA 进行切割。不过目前还未见到有关成功应用反义技术来治疗水产养殖动植物病毒性疾病的报道,但作为一种特异性较强的治疗技术,反义技术还是很有应用开发潜力的。

### 4 结语

目前分子生物学发展非常迅速,应用也非常广泛。但从总体上来说,不管是国内还是国外,将分子生物学技术应用于水产养殖业目前还很不广泛,尚处于起步阶段。虽然如此,近些年来国际上许多国家竞相利用分子生物学技术来改造传统的水产养殖业。我国作为一个水产养殖大国,水产养殖业发展较快,但也面临育种、病害防治等诸多挑战,因此将分子生物学技术以及其他现代生物技术应用于水产养殖优良品种培育、种质鉴定、病原体检测以及疾病防治等领域就很有发展潜力和经济价值,并且将对水产养殖业的发展产生重大而深远的影响。

#### 主要参考文献

- 1 秦松等.海洋与湖沼,1996,27(1):103~111
- 2 秦松等.生物工程进展,1996,16(6):9~12
- 3 章怀云等.水生生物学报,1998,22(2):168~173
- 4 项超美等.水生生物学报,1998,22(3):251~256
- 5 周莉等.水生生物学报,1998,22(4):301~306
- 6 洪水根.福建水产,1996,3:55~61
- 7 Eenenaa m, A. L. V. et al. . *Aquaculture*, 1996, 147:177~189
- 8 Noel, T. et al. . *Aquaculture*, 1996, 146:171~178

(本文编辑:刘珊珊)