

我国海水养殖鱼类生物技术的前景展望*

PERSPECTIVE ON AQUACULTURED MARINE FISH BIOTECHNOLOGY IN CHINA

王 勇 张培军

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

我国海水养殖业在经过了海带、对虾、扇贝三次养殖高潮后,目前正遭受病害的困扰。近年来,虾、贝类的大规模死亡时有发生,个别年份在个别地区甚至出现绝产的恶性事件,直接影响到我国水产业的发展。有关专家认为,从淡水养殖业的发展历史来看,直到淡水鱼类形成一定的养殖规模后,淡水养殖业才走向稳定发展的道路。因此,海水鱼类养殖业的兴起,必将带动整个海水养殖业的发展。

搞好海水鱼类的养殖,必须依靠科学管理和科技进步,尤其是要

利用生物技术手段,提高产品的附加值,并为我国养殖业的可持续发展提供可靠的保障。在未来的5~10 a内,必须把握好我国海水鱼类生物技术的研究方向,瞄准关键问题,予以攻关解决。

针对我国海水鱼类养殖业的现状和国际养殖业的发展趋势,未来5~10 a我国海水鱼类生物技术的研究应注意以下几个方面的问题。

1 良种培育问题

要花10 a左右的时间,真正培育出几个优良品种。目前,我国海

水鱼类的养殖,主要依靠海捕亲鱼产卵、繁殖。海捕亲鱼的数量有限,更谈不上对亲鱼的挑选,因此鱼卵的质量很不稳定,育苗成功与否在很大程度上靠运气,这是野生种的严重缺陷。在“九五”期间,我国的“863”计划资助了用细胞工程手段

* 国家863计划资助项目8190F03号。
第一作者:王勇,出生于1968年,博士,助理研究员。

E-mail: devbiol@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2000-06-13;

修回日期:2000-07-13



进行牙鲆的遗传育种工作,目前已经取得了可喜的成绩,但我国海水鱼类的遗传育种工作才刚刚起步。最近国内有人尝试用杂交育种的手段进行良种培育,由于没有纯系,结果很不理想。此外鱼类的性成熟周期长(2~3 a),也是制约海水鱼类遗传改良发展的一大障碍。今后,应当使用细胞工程方法,尽快建立海水鱼类的纯系,这是进行遗传育种的重要手段。应当在未来5~8 a内建立几种主要海鱼的纯系,在此基础上,再进行各种遗传改良研究。此外,据周百成1997年报道,使用细胞工程手段(如全雌技术、全雄技术、三倍体技术等)培育生长快速的海鱼也是育种中的重要手段。

目前,国际上进行遗传育种研究,往往采用先进的DNA分子标记辅助育种技术。遗传标记主要分为形态标记、细胞学标记、生化标记和DNA分子标记4种类型。而分子标记辅助育种是指:通过对与目标性状紧密连锁的DNA分子的追踪检测,实施对目标性状的间接选择。分子标记种类繁多,分类也不尽相同,主要有RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)、随机扩增多态性DNA(Random Amplified Polymorphic DNA)、小卫星DNA(Mnisatellite DNA)、微卫星DNA(Microsatellite DNA)、以及扩增片段长度多态性(Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP)、单链构象多态性标记(Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)等^[1-3]。据尹佟明1997年报道,在各种分子标记中,由于RFLP所提供的信息量少、RAPD结果重复性差,因此人们越来越倾向于使用AFLP和微卫星DNA技术^[4,5]。利用分子标记技术,可以进行种质资源中重要经济性基因的分子作图与标记,在育种中可以不受环境条件的干涉与影响,做到准确地对育种目标进行选择,这将大大缩短育种

周期,提高育种效率。分子标记育种代表了育种的发展方向,有人认为,它的应用将产生育种方法上的一场革命。海洋动物分子标记研究起步较晚,已有的研究成果主要集中于对遗传多样性的调查,遗传图谱的构建工作刚刚起步,只在大西洋鲑鱼、虹鳟、褐鳟中进行了研究^[6,7]。这些对于分子育种是远远不够的,今后应当努力发展这一领域的研究。目前,在短时间内尚无法获得优良品系,但可以用分子标记技术选择亲鱼,这在一定程度上也可改善子代鱼的性状。

2 鱼病的诊断和防治

鱼病的诊断和防治也是必须深入研究的。近20a来,我国海水鱼类的养殖从种苗生产到商品鱼养成,都象日、英、美、挪威等发达国家一样朝集约化方向发展。生活在天然海域中的鱼类,由于环境条件优越,密度低,饵料鲜活,发生疾病并导致大量死亡的情况很少见,但在人工养殖条件下,特别是在集约化养殖条件下,由于生态环境、鱼体密度、饵料的质量等因素都与天然情况差别很大,所以各种疾病就随之发生。在海水鱼病中约95%是由细菌引起的,约5%是由病毒和原生动物引起的。海鱼发病往往不是由单一病原体引起的,而是多种因素综合作用的结果。因此系统深入地研究影响我国海鱼养殖的主要病原体的种类、作用途径和致病机理,揭示病原与宿主相互作用的规律性,这是进行鱼病防治的基础和关键。

可以利用最先进的技术手段建立起可靠、快速、简便的病原体检测技术和鱼体抗病力的评价指标体系。可首先进行主要海水养殖鱼类的生理、生化指标的正常值测定,并建立起相应的常规检测方法。

病原体检测技术的开发,主要应开展针对病原体的蛋白和核酸的检测技术。如针对蛋白质的各种

免疫检测方法,包括酶联免疫分析、免疫PCR、免疫沉淀和免疫电泳等等,针对核酸的各种PCR技术,包括普通液相PCR、毛细管PCR、组织切片的原位PCR、定量PCR,以及针对RNA病毒的RNA检测技术,包括液相RT-PCR、组织切片的原位RT-PCR、自主序列复制(self-sustained sequence replication, 3SR)技术^[8,9]。此外,在用于免疫检测的抗体制备中,除可以用血清多克隆抗体和杂交瘤产生的单克隆抗体之外,还可以使用80年代发展起来的基因工程抗体,如源于杂交瘤的基因工程单链抗体,但目前最具发展前景的是90年代初诞生的噬菌体抗体库技术。噬菌体抗体库是在膜表面表达有抗体分子Fab段或单链抗体的单链噬菌体(或称纤丝状噬菌体,最常见的如M13噬菌体),这种膜表达是通过Fab段或单链抗体与单链噬菌体外壳蛋白(蛋白III或蛋白VIII)形成融合蛋白而完成的。噬菌体抗体的主要特点是它既可以识别相应抗原与其结合,又能够感染宿主菌进行再扩增。将B淋巴细胞全套可变区基因克隆出来,组装成噬菌体抗体的群体,则成为噬菌体抗体库^[10,18,22]。在核酸检测技术中最值得一提的是微板核酸杂交技术和生物芯片技术。微板核酸杂交技术,是将基因扩增、核酸杂交与抗原酶联显色三种技术融合为一体,具有灵敏度高、特异性强、定量准确、操作简便等优点,可在一般实验室内开展工作。生物芯片技术是90年代初期发展起来的一门新兴技术。通过微加工技术制作的生物芯片,可以把成千上万乃至几十万个生命信息集成在一个很小的芯片上,达到对基因、抗原和活体细胞等进行分析的目的。用这些生物芯片制作的各种生化分析仪和传统仪器相比较具有体积小、重量轻、便于携带、无污染、分析过程自动化、分析速度快、所需样品和试剂少等诸



多优点。这类仪器的出现将给生命科学研究和疾病诊断带来一场革命。因此,生物芯片现已成为各国学术界和工业界所瞩目的一个研究热点^[11]。生物芯片技术包括基因芯片技术(也叫微阵列技术)^[12-20]、芯片免疫技术、芯片核酸扩增技术^[17]、芯片精子选择和体外受精技术、芯片细胞分析技术和采用芯片作平台的高通量药物筛选技术^[19]等。基因芯片技术是其中应用最广、最有发展前途的技术。基因芯片是将成千上万种寡核苷酸探针按矩阵方式排列在一张载玻片上,用点样仪器点样后杂交,杂交结果经计算机图象处理程序分析后,输出检测结果。用该技术还可研究病原菌的转录图谱^[21]。这一技术的最大优点在于筛查量相当大,可一次筛查成千上万个 DNA 序列,是今后进行病原体检测和研究基因表达的最强有力的工具,缺点是造价昂贵、难以普及,且需要大量的 DNA 序列资料作基础。

在疾病防治方面,应当采用疫苗防治与被动免疫相结合的方法,首先着重解决育苗期鱼发病的问题,进而解决成鱼的病害问题。考虑到鱼病以细菌病为主,应当首先研制细菌性疫苗。疫苗给予方式主要有肌肉注射、浸泡、口服等几种方式,应针对不同情况,分别研制不同剂型的疫苗。如针对养殖面积大、鱼体小的情况,可采用浸泡、口服等方式,如针对个体大的亲鱼,可采用肌肉注射方式。在口服疫苗中,胶囊化疫苗具有诸多优点,是应当予以重视的。被动免疫方法,可采用基因工程手段制备抗体,来中和病原体。

3 饵料的研制

目前我国已自行研制出多种鱼用饵料,但仍不能满足多方面的需要。首先,应当深入细致地研究各主要养殖鱼类的营养需求,包括蛋

白质、氨基酸、脂类、糖类等主要营养物质,其中尤其要注意微量元素和维生素的摄入量 and 摄入比例。对营养需求的研究,既要研究各种鱼的营养特点,又要研究同一种鱼在不同生长发育阶段、在不同地域、不同养殖环境、不同生理状态(如各种疾病状态)下的营养需求。在此基础上,研制针对各种鱼的营养平衡的饵料和针对同一种鱼不同情况的系列化饵料。据罗函禄 1997 年、汪铭书 1997 年、张春杰 1997 年报道,在家禽和家畜中广泛使用卵黄抗体,对提高家禽和家畜的抗病能力起到了非常有效的保护作用^[13]。卵黄抗体的制备就是将疫苗掺入鸡的饲料中,鸡吃了含有特定疫苗的饲料后,产下的鸡蛋卵黄中就含有抗特定病原菌的抗体;将卵黄分离出来,掺入家禽或家畜的饲料中,就可起到被动免疫的作用^[14,15]。使用卵黄抗体可以弥补疫苗免疫的不足,因为疫苗免疫只能防病不能治病,而卵黄抗体恰好可以起到治疗的效果。此外,针对鱼病常用的药物如抗生素、磺胺类、呋喃类、有机磷类等对养殖鱼类所产生的副作用很大,对水产养殖的病害防治从整体上来说弊多利少^[16];而卵黄抗体则避免了上述药物的副作用。因此,如果把卵黄抗体技术与海水鱼类饵料研制技术结合起来,制成含有抗特定病原菌卵黄抗体的饵料,就可以在海水鱼类的疾病防治中起到不可估量的作用。

最后,特别值得一提的是鱼类生物学的基础研究。鱼类生物技术的确能够带来可观的经济效益,但是,鱼类生物技术的发展离不开鱼类生物学的基础研究,后者是根本。我国鱼类生物学的基础研究目前还很薄弱,应当投入相当的研究力量开展这方面的工作。最近国家重大基础研究项目启动了一项海洋生物的研究项目,但因为该项目

只涉及抗病力的基础研究,不可能一下子解决很多问题,因此,还需要国家对该领域提供长期、持续的稳定支持。鱼类生物学的基础研究内容,在近期固然可聚焦于与鱼类抗病有关的各方面,但从长远考虑,还应当尽可能进行较为全面的研究,为今后生物技术的发展作好各方面的储备和准备工作。此外,还应当启动养殖鱼类的基因组计划,不一定象人类基因组计划那样,构建大量的图谱和进行基因组全序列测定,可以只对代表鱼种(如北方的牙鲆)构建物理图谱和遗传图谱,并进行一定规模的测序工作,筛选出一定数量的功能基因(尤其是与鱼类某些生物学性状相关联的基因)。这样,就可以为建立和鉴定海水鱼纯系和进行大规模的分子标记辅助育种奠定坚实的基础。

参考文献

- 1 钱惠荣、郑康乐。DNA 标记和分子育种,生物工程进展,1998,18(3): 12~18
- 2 张艳、张树义。微卫星方法简介,动物学杂志,1999,34(2): 42~45
- 3 成廷水、刘定发。利用遗传标记预估畜禽杂种优势的研究,生物学杂志,1999,16(3): 5~6
- 4 何平。真核生物中的微卫星及其应用,遗传,1998,20(4): 42~47
- 5 刘春林、官春云、李恂。植物 RAPD 标记的可靠性研究,生物技术通报,1999,15(2): 31~34
- 6 潘洁、包振民、万俊芬等。分子标记技术及其在育种中的应用,青岛海洋大学学报,2000,30(2 II): 25~31
- 7 董在杰、夏德全、吴婷婷等。RAPD 技术在鱼类杂种优势研究中的应用,中国水产科学,1999,6(1): 37~40
- 8 苏慧慈、刘彦仿。原位 PCR。北京:科学出版社,1997。138~150

(下转 46 页)

(上接 25 页)

- 9 杨瑞馥,林万明.自主序列复制系统.见:林万明主编.PCR技术操作和应用指南.北京:人民军医出版社,1995.94~95
- 10 钱玉昆主编.实用免疫学新技术.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1994.79~84
- 11 许俊尔,贺学志,周玉祥等.生物芯片技术的发展与应用,科学通报,1999,44(24):2600~2606
- 12 何志巍,姚开泰.DNA微阵列(或芯片)技术原理及应用,生物化学与生物物理进展,1999,26(5):507~510
- 13 肖驰,周淑兰,涂志等.鸡抗猪大肠埃希氏菌卵黄抗体的研制与应用,中国兽医科技,1998,28(4):21~23
- 14 刘旭光,蒋长苗,丁建平.鸡卵黄抗体IBD免疫球蛋白的提取与应用研究,中国家禽,1998,20(9):12~13
- 15 常维山,牛钟相,张万福.利用苯酚从卵黄中提纯卵黄抗体的研究,中国兽医科技,1998,28(10):10~11
- 16 李传伦,朱清贤.鱼病防治用药的负面效应,水产科学,1999,18(4):46~47
- 17 Belgrader P., Sminth J. K., Weedn V. W. *et al.*. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument, *Clinical Chemistry*, 1998,44:2191~2194
- 18 Bruin R., Spelt K. & Ml J. *et al.*. Selection of high affinity phage antibodies from phage display libraries, *Nature Biotechnology*, 1999, 17(4):397~399
- 19 Debouck C., Goodfellow P. N. . DNA microarrays in drug discovery and development, *Nature Genetics*, 1999, 21:48~50
- 20 Ramsay G. . DNA chips: State of the art, *Nature Biotechnology*, 1998,16(1):40~44
- 21 Saizieu A., Certa U., Warrington J. *et al.*. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays, *Nature Biotechnology*, 1998,16(1):45~48
- 22 Vaughan T. J., Osbourn J. K. & Tempest P. R. . Human antibodies by design, *Nature Biotechnology*, 1998, 16(6):535~539

辅助参考文献

- 周百成.海洋生物技术——机遇和挑战并存的新领域,生物工程进展,1997,17(6):51~54
- 郑康乐,黄宁.标记辅助选择在水稻改良中的应用前景,遗传,1997,19(2):40~49
- 尹俊明,黄敏红.AFLP分子标记及其在植物育种上的应用,生物工程进展,1997,17(1):6~12
- 罗函禄.高免卵黄抗体的应用及其展望,江苏农业科学,1997,5:62~63
- 汪铭书,程安春,陈孝跃.应用高免卵黄抗体防治鸭病毒性肝炎的研究,中国畜禽传染病,1997,5:14~17
- 张春杰,程相朝,郑祥海.实验感染IBD雏鸡经卵黄抗体治疗后对ND疫苗的体液免疫应答,中国畜禽传染病,1997,2:51~52

(本文编辑:刘珊珊)