

# 现代生物技术在水产动物健康养殖中的应用<sup>\*</sup>

孔祥会<sup>1,2</sup>, 王桂忠<sup>1</sup>, 李少菁<sup>1</sup>

(1. 厦门大学海洋学系 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453002)

**摘要:** 现代生物技术的应用对水产动物健康养殖产生了很大的影响 本文从水产动物疾病诊断, 高效疫苗制备, 抗病品种培育, 提高抗病力, 水体污染监测等方面对现代生物技术的应用进行了综述 旨在为水产动物健康养殖及相关研究提供参考

**关键词:** 现代生物技术; 水产动物; 健康养殖; 应用

**中图分类号:** Q 789

**文献标识码:** A

随着人们生活水平的提高, 对水产品的需求已经从数量型转向质量型, 优质健康的水产品日益得到人们的青睐 优质高产是今后渔业的发展方向 无病无伤, 体色鲜艳的健康水产品才能满足市场的需求 传统的养殖模式由于水产动物发病时大量使用氯制剂、硫酸铜和孔雀石绿等药物, 结果由于残毒影响, 很难生产出健康的水产品 近几年来现代生物技术在水产养殖业上的运用和发展为水产动物的健康养殖揭开了新的篇章

## 1 水产动物微生物病原体的检测

分子生物学方法出现之前, 水产动物微生物疾病的诊断主要依赖于组织细胞培养, 病原体表型鉴定, 血清学分析或组织病理学检查 微生物疾病病原体鉴定过程复杂, 耗费时间较长 而其发生和传播又非常快 往往由于不能现场鉴定和及时治疗, 造成经济重大损失 分子生物学技术的出现为微生物病原体的鉴定提供了直接的方法, 简化了诊断的时程, 使水产动物疾病诊断发生了根本性的变革<sup>[1,2]</sup> 分子生物学诊断在检测病原体方面之所以具有独到的优越性, 是因为它检测灵敏度较高, 不需要体外培养 通过检测遗传多态性或者基因突变来确定和鉴别病原, 多态性鉴别灵敏度较高, 不同种类和品系的单个核苷酸插入, 删除, 突变均可检测 目前在水产动物病原体诊断上常用的分子生物学方法有限制性酶切, 探针杂交和 PCR 等

### 1.1 限制性酶切 (Restriction enzyme digestion) 检测

限制性酶可识别DNA 上较短的序列, 在识别位点上切开DNA, 单个核苷酸变化即可导致限制性酶切位点的增加或缺失, 因此, 酶切后产生的片段数目发生了改变, 即所谓的限制性片段长度多态性 (Restriction length polymorphism, RFLP). 然后进行凝胶电泳, 酶切后的DNA 片段根据大小在凝胶电泳上进行分离, 染色后即可观察各个不同的片段, 进行遗传变异的分析 不同样品总DNA 酶切后即可产生限制性酶切多态性 然而检测这些多态性差异时, 需要使用标记的DNA 探针来加以确定<sup>[3,4]</sup> 另一种方法可以不需要DNA 探针杂交, 首先对DNA 片段进行限制性酶切, 然后靶定DNA 特定片段, 通过 PCR 扩增, 来显示限制性片

\* 收稿日期: 2002- 12- 18

基金项目: 国家863重大专项 (2002AA 603013)

作者简介: 孔祥会 (1968~), 男, 河南虞城人, 河南师范大学讲师, 厦门大学博士生 主要研究方向为水生动物生理生化及健康养殖

段多态性, 即所谓的扩增片段长度多态性 (Amplification fragment length polymorphism, AFLP)<sup>[5,6]</sup>。对病原微生物而言, 这种诊断是相当有用而直接的方法<sup>[3,4,5,6]</sup>。也可以鉴别特定的寄生虫<sup>[7,8]</sup>。Chang, Y. S. et al (2001) 从美国三个不同的海岸水体 (New York, New Jersey, and Texas) 收集的蓝蟹 (*Callinectes sapidus*), 通过 PCR 和原位杂交分析两步诊断证实存在白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV)。通过 RFLP 方法, 对于一个 1156bp 片段的 WSSV *rrl*-specific *RsaI* 进行扩增, 从而区别 New Jersey 蓝蟹 WSSV 和其它地方分离的 WSSV<sup>[9]</sup>。

### 1.2 探针杂交 (Probes, Hybridisation) 检测

特异性的核酸探针杂交是鉴定病原体十分有效的方法, 探针可用来检测和确定病原体特定序列, 甚至被其它核苷酸片段污染的样品也可检测。然而探针的设计及杂交的条件要求严格, 主要目的是确保探针和样品中互补核酸序列特异性结合。关于核酸探针的标记和检测系统的多样性, Tijssen, P. (1993) 进行了综述<sup>[10]</sup>。目前常用的标记有半抗原诸如生物素或地高辛<sup>[11]</sup>和荧光标记<sup>[12]</sup>。标记和检测方法多样性能提供适宜的系统进行点印迹或原位杂交。限制性酶切之后, 可以用探针来确定和检测片段, 尤其在多种片段混合物的情况下, 通过探针和随后凝胶电泳确定片段的相对位置, 可以鉴定样品。组织切片也可运用原位杂交探针, 来检测病原体在组织和细胞内的定位。在对特定病原进行大规模调查时, 这种方法的运用具有较大的优点。也可以设计适当的探针来检测鱼类, 贝类和虾蟹类原生动植物寄生虫<sup>[13,14]</sup>。

Venkateswaran, K. et al (1998) 使用了旋转酶 B 基因 (*gyrase B gene, gyrB*) 作为分子诊断探针。可在用病毒 (*V. parahaemolyticus*) 人工接种的 27 个虾样本中检测到病毒。对于虾中 *V. parahaemolyticus* 病毒的检测提供了一个快速、可靠、灵敏的方法<sup>[15]</sup>。Mari, J. et al (1998) 从纯化的 TSV (Taura Syndrome Virus) 提取 ssRNA 基因, 转录成双链 cDNA 并且被用来构建 cDNA 文库。然后通过载体和质粒重组的方法筛选两个特异性的 pP15 和 pQ1 探针, 通过 northern blots 和 dot blots, 两个探针能够特异性地与提取的 RNA-TSV 基因, TSV 和感染的 TS 虾组织匀浆液进行杂交。这两个探针在对 TS 病虾组织切片原位杂交实验中也得以证实<sup>[16]</sup>。

### 1.3 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 检测

PCR 是用来扩增特定 DNA 片段序列的快速方法。通过设计核苷酸引物, 在特定的条件下可以和目标 DNA 结合, 然后延伸, 进行扩增。由于 PCR 受多因素影响, 即使产物中出现了某一 DNA 片段, 也难以肯定样品被某一特定病原体感染。还需进一步试验 (如限制性酶切, 探针杂交或核苷酸测序) 增加诊断的特异性<sup>[17]</sup>。实际上, 应用过程中往往是多种方法结合使用。Walton, A. et al 在 1999 年报导了 P 病毒探针的构建, P 病毒基因组杂交探针, 可通过 PCR 大量制备。然后用来进行点印迹或者原位杂交特异地检测自然或实验室感染动物的组织和细胞。这是对于温带蟹地方性病毒构建的第一个基因探针, 对于病毒生态, 病毒和寄主相互作用研究是非常重要的<sup>[18]</sup>。成年斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 用 WSSV 病毒接种, 通过 RT-PCR 分析在感染 4 h 后, *tk- $\mu$ k* 基因的转录可以检测到<sup>[19]</sup>。随着 PCR 技术的发展和运用, 现在已有多种病原体的 PCR 诊断试剂盒问世, 并在现代水产养殖上开始用于病原体的识别和诊断。随着 PCR 反应条件的优化和使用设备的简化, 相信不久的将来, PCR 诊断就会在水产养殖发病现场快速进行。

## 2 高效免疫疫苗的制备

养殖水产动物的免疫过去往往倾向于使用病毒和细菌的联合疫苗, 要么用病原微生物培养, 制成病毒或细菌的悬液, 然后灭活, 制备灭活疫苗; 要么直接用典型病鱼的内脏组织 (如肝胰腺等) 制备组织浆灭活疫苗, 免疫效果相对较差。现在水产养殖已转向使用 DNA 疫苗或基因工程疫苗。

### 2.1 DNA 疫苗

DNA 疫苗是基于直接注入编码抗原部分蛋白 (通常是细胞外膜或病毒蛋白衣壳) 的裸 DNA, 以便于这种蛋白质能够在体内表达, 从而诱导抗体的产生。这种方法已经在鱼类免疫中大量使用。一个成功的例子是大西洋鲑, 使用编码传染性肝脏坏死病毒 (Infectious hematopoietic necrovirus, IHNV) 糖蛋白的质粒进行注入, 在巨细胞病毒启动子 (cytomegalovirus promoter, pCMV) 的调控下表达。结果显示在感染病毒 8 周

后, 具有明显的免疫保护效果。抗病毒抗体在初始免疫后能够产生, 在后来感染后免疫效价提高<sup>[20]</sup>。最近研究表明纳克(ng)数量级的DNA即可有效地引发这种反应<sup>[21]</sup>。在虹鳟鱼免疫防护VHS病毒(viral haemorrhagic septicaemia virus, VHS)时, 利用糖蛋白编码序列, 由pCMV启动也观察到了相同的效果<sup>[22]</sup>。这些方法的优点是注入裸DNA在体内表达, 免疫效价较高, 但主要缺点是对病原蛋白的结构和组成需要详细的了解。再者, 即使优化的疫苗也趋向于一个较窄的效应范围, 而且对大多数水产动物而言, 免疫机理还不够清楚。

## 2.2 基因工程疫苗

基因工程疫苗是通过分离病原体中具有免疫活性的抗原基因, 在体外表达系统中生产特定抗原蛋白来制作疫苗。它的优点在于: 1. 抗原专一, 避免了常规灭活疫苗将整个病原基因转入鱼体, 从而造成潜在的危害; 2. 可将多个抗病基因克隆到同一载体, 然后进行表达, 制备复合疫苗; 3. 可应用发酵技术进行大规模生产。Gilmore等[1988]从传染性肝脏坏死症病毒IHNV中分离到一种糖蛋白基因G, 并将其中Sau3A I片段组合到大肠杆菌(*E. coli*)中, 得到一种糖蛋白抗原, 具有较强的免疫原性, 能有效地防治传染性肝脏坏死症病毒的感染<sup>[23]</sup>。

## 3 提高机体对病原体的抵抗力

抗菌肽基因在鲑鱼中表达的蛋白水平与抗病程度密切相关<sup>[24]</sup>。许多编码抗菌肽的基因, 包括溶菌酶基因, 导入转基因鱼后, 以使转基因鱼具有鲑鱼溶菌酶基因, 从而提高其抗病能力, 免疫效应, 促进吞噬细胞的吞噬能力和提高它们的抗菌活性, 从而提高对疾病的抗性。

非特异性免疫保护机制虽然是暂时的, 但在免疫应答中对鱼类是有效的。葡聚糖, 甲壳素和左咪唑可提高噬菌细胞的活性, 酵母葡聚糖和维生素C可活化补体活性, 此外左咪唑和生长激素也可活化NK细胞, 这些均显示能增强特定的免疫反应<sup>[25]</sup>。这些物质可提高对环境应激因子的耐受性和广谱抗菌性, 适合应用于水产养殖。可与疫苗相互补充, 增强抗病能力。可是免疫刺激物只能通过注射给予, 过量往往会造成机体的免疫抑制。注射本身也会对鱼类产生刺激, 对小鱼使用不适宜。所以有必要研究能够调控的基因, 来激活这些免疫应激物。当鱼受到外界环境因子应激(如微生物感染)时, 可通过启动子进行活化。

## 4 抗病品种的培育

分子标记在育种中对于筛选可遗传的优良性状(如生长率、产卵率、抗病等)是十分有效的方法<sup>[26, 27, 28]</sup>。相关基因的遗传位点可绘制成遗传图谱, 在水产动物育种上可使用图谱相应的标记。目前, 遗传标记最常用的是限制性片段长度多态性(RFLP)和微卫星(Microsatellites)。第一种方法是用限制酶切割DNA产生不同长度的片段。DNA片段中一旦出现限制性位点的缺失, 一定数目的插入和删除, 酶切后即会产生不同的片段。也可以用切割DNA方法对限制性位点进行改变, 即AFLP扩增片段长度多态性。这项技术的优点是可对这些片段进行扩增。限制性片段可用已知序列的探针检测来构建遗传图谱。另一个可选择的方法是使用串联重复序列的微卫星, 在一个较高的个体变异中, 能复制出许多倍的重复短序列(Short sequence repeats, SSR)。虽然每一技术都有各自的优缺点, 但它们对于遗传多样性研究和基因图谱绘制来说是非常有用的工具。在水产养殖上, 这些方法已用来研究许多种类的遗传起源、种质资源及遗传多样性<sup>[26, 27, 28]</sup>, 同时也可以对同种的不同种群进行鉴定<sup>[29]</sup>。

水产养殖上, 根据需要对水产动物特定特征已开展了分子定位标记研究, 构建了许多遗传图谱。斑马鱼遗传图谱由Postlethwait, J. H. (1994)首先构建, 它包括414遗传标记, 空间跨度平均为5.8 cM<sup>[30]</sup>。后来Shimoda, N. et al (1999)构建了一个具有2000标记的斑马鱼遗传图谱, 平均跨度1.2 cM<sup>[31]</sup>。Naruse, K. et al (2000)在青鳉中构建了一个覆盖1354.5 cM更为全面的遗传连锁图谱, 其中对应于染色体的单倍体绘制了633标记, 发现24个连锁群。使用这种图谱, 新的基因很容易定位。这样一来, DNA标记与特定表型就会一一对应<sup>[32]</sup>。

最近, 这项技术应用于虹鳟的选择育种, 选择对感染性肝脏坏死病毒(IHNV)的抗病品种。使用一个

包含有干扰素诱导基因的位点, 可区别七个不同模式, 从而鉴定抗病品种和易感品种<sup>[33]</sup>。数量遗传特征可用数量型特征位点 (quantitative trait loci, QTL) 来确定。连锁已知的个体可通过产生的标记来确定, 构建一个连锁图谱, 显示在每个标记之间的相对距离。进行统计分析找出这些标记与感兴趣的特征之间的关联。QTL 已经在许多植物商业化生产上得到应用。分子标记辅助育种用这个方法从种间杂交来选择罗非鱼耐低温和耐盐新品系。也可以通过微卫星和 AFLP 标记鉴别水产动物及畜禽的品质<sup>[34]</sup>。

## 5 水体污染的监控

随着经济的快速发展, 来自工业废水和生活污水的污染已影响到社会生活的各个方面, 尤其是严重影响到水产养殖业。鱼类可因水质污染引起生殖功能障碍, 雄鱼雌性化<sup>[35,36]</sup>。水体中重金属和某些有机物可引起水生生物发生生理生化反应, 这些生理生化反应可以检测和用作生物标记, 来监测水体污染的水平。最常见的是细胞色素 P4501A, 当水体中有机化合物 (如芳香烃和二氧化杂芑) 出现时, P4501A 基因可被污染物诱导表达, 通过检测其 mRNA 和蛋白质水平上的变化来监测污染。金属硫蛋白可被重金属特异性诱导表达, 也可作为生物标记<sup>[37]</sup>。目前研究更倾向于通过直接与生物传感器结合, 来启动 DNA 的合成。生物传感器就是利用环境中某些污染物通过酶促反应专一性诱导或抑制某一物质的生成, 新物质的生成又可促使或诱导生物体某一特定蛋白的表达。由于大多数生物传感器对化合物具有特异性, 所以这种方法的运用存在局限性。目前的研究是把编码绿色荧光蛋白的基因 (Green fluorescent protein, GFP) 整合到许多对水体污染有反应的启动子上, 这些启动子位于一些诱导型基因上。诱导型基因一般包括 (1) 可被重金属或化学毒素所诱导 (如那些编码热休克蛋白和金属硫蛋白的基因), (2) 可被肿瘤致癌物诱导 (如肿瘤标记基因), (3) 可被雌激素诱导 (如水体中出现雌激素合成所需元素时, 雌激素生成增多)。当诱导型基因表达时, 荧光蛋白基因也随之表达。表达强度与水体污染呈正相关。我们即可用肉眼观察荧光强弱, 来判断污染程度大小。水生生物中使用 GFP 报告基因转入, 表达作为水质污染的生物连续监测器<sup>[38]</sup>, 可以快速提供可视的结果, 从而避免酶或者特定蛋白分析的繁琐。

## 6 结束语

现代生物技术的应用为水产养殖业的发展带来了革命性的变化, 从水产动物遗传多样性、种质资源、新品种培育、免疫预防、疾病诊断、水质监测等各个方面无一不渗透分子生物学的应用。在水产动物健康养殖上更显示其独有的优势, 根据水产动物微生物疾病发病快的特点, PCR 及其探针的诊断直接而快速, 可解决长期以来疾病诊断时程长的问题。然而其在生产上的真正应用, 还有待于检测条件的优化, 仪器的简化, 廉价试剂盒的研制。免疫防护是水产动物健康养殖的重点, 要从水体, 病原体和机体等多个方面研究和增强动物自身对疾病的免疫能力。我国目前水产动物健康养殖得到了政府的重视, 投入了大量的人力和资金进行研究和调控, 展现了良好的发展态势。但就目前而言, 水产动物疾病的病原体区系普查, 病原发生及诊断, 抗病品种培育, 疫苗制备, 免疫防护机理等有必要加强研究。政府也有必要加大力度防止养殖用水污染, 控制养殖品种的交叉引进, 规范水产健康养殖的法规。从而使水产健康养殖走上可持续发展的道路。

## 参 考 文 献

- [1] Wagener C. Molecular diagnostics [J]. J Mol Med, 1997, 75: 728~ 744
- [2] McKeever D J, Rege J E O. Vaccines and diagnostic tools for animal health: the influence of biotechnology. Livest [J]. Prod Sci, 1999, 59: 257~ 264
- [3] Austin B, Austin D A, Blanch A R, et al. A comparison of methods for the typing of fish-pathogenic *Vibrio* spp. [J]. Syst Appl Microbiol, 1997, 20: 89~ 101
- [4] Borrell N, Acinas S G, Figueras M J, et al. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35: 1671~ 1674
- [5] Hanninen M L, Hirvela-Koski V. Pulsed-field gel electrophoresis in the study of mesophilic and psychrophilic *Aeromonas*

- spp. [J] *J Appl Microbiol*, 1997, 83: 493~ 498
- [6] Talaat A M, Reimschuessel R, Trucksis M. Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis [J] *Vet Microbiol*, 1997, 58: 229~ 237.
- [7] Cunningham C O. Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea; Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes [J] *J Parasitol*, 1997, 83: 215~ 219
- [8] Cunningham C O, McGillivray D M, MacKenzie K, et al. Identification of *Gyrodactylus* (Monogenea) species parasitising salmonid fish using DNA probes [J] *J Fish Dis*, 1995, 18: 539~ 544
- [9] Chang Y S, Peng S E, Wang H C, et al. Sequencing and amplified restriction fragment length polymorphism analysis of ribonucleotide reductase large subunit gene of the white spot syndrome virus in blue crab (*Callinectes sapidus*) from American coastal waters [J] *Mar Biotechnol*, 2001, 3 (2): 163~ 171
- [10] Tijssen P. Hybridisation with Nucleic Acid Probes [M]. Elsevier, Amsterdam, 1993, 613
- [11] Cunningham C O. Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea; Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes [J] *J Parasitol*, 1997, 83, 215~ 219
- [12] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation [J] *Nat Biotechnol*, 1996, 14, 303~ 308
- [13] Morris D J, Adams A, Richards R H. In situ hybridisation of DNA probes to PKX, the causative organism of proliferative kidney disease (PKD) [J] *J Fish Dis*, 1999, 22: 161~ 163
- [14] Kleeman S N, Aldard R D. Molecular detection of  *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters [J] *Dis Aquat Org*, 2000, 40: 137~ 146
- [15] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S, et al. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp [J] *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64 (2): 681~ 687.
- [16] Mari J, Bonami J R, Lightner D V. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes [J] *Dis Aquat Org*, 1998, 33 (1): 11~ 17
- [17] McBeath A J A, Burr K L A, Cunningham C O. Development and use of a DNA probe for confirmation of cDNA from infectious salmon anaemia virus (ISAV) in PCR products [J] *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 2000, 20: 130~ 134
- [18] Walton A, Montanie H, Acrier J M, et al. Construction of a gene probe for detection of P virus (Reoviridae) in a marine decapod [J] *J Virol Methods*, 1999, 81 (1-2): 183~ 192
- [19] Tsai M F, Yu H T, Tzeng H F, et al. Identification and characterization of a shrimp white spot syndrome virus (WSSV) gene that encodes a novel chimeric polypeptide of cellular-type thymidine kinase and thymidylate kinase [J] *Virology*, 2000, 277 (1): 100~ 110
- [20] Traxler G S, Anderson E, LaPetra S E, et al. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* against IHNV [J] *Dis Aquat Org*, 1999, 38: 183~ 190
- [21] Corbeil S, LaPetra S E, Anderson E D, et al. Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus [J] *Vaccine*, 2000, 8: 2817~ 2824
- [22] Lorenzen N, Olesen N J, Koch C. Immunity to VHS virus in rainbow trout [J] *Aquaculture*, 1999, 172: 41~ 61
- [23] Gilmore R D. Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protects against viral challenge [J] *Bio Tech*, 1988, 6 (3): 295~ 300
- [24] Demers N E, Bayne C J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout [J] *Dev Comp Immunol*, 1997, 21: 363~ 373
- [25] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J] *Aquaculture*, 1999, 172: 63~ 92
- [26] Jennekenes I, Muller-Belecke A, Horstgen-Schwark G, et al. Proof of the successful development of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* clones by DNA fingerprinting [J] *Aquaculture*, 1999, 173: 377~ 388
- [27] Felipe A, Martinez-Rodriguez G, Piferrer F, et al. AFLP analysis confirms exclusive maternal genomic contribution of meiogonetic sea bass *Dicentrarchus labrax* [J] *Mar Biotechnol*, 2000, 2: 301~ 306
- [28] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers [J] *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 88: 133~ 139

- [29] Verspoor E, McCarthy EM, Knox D. The phylogeography of European Atlantic salmon *Salmo salar* L. based on RFLP analysis of the ND1 r16S rRNA region of the mtDNA [J]. *Biol J Linn Soc*, 1999, 68: 129~ 146
- [30] Postlethwait JH, Johnson SL, Midson CN, et al. A genetic-linkage map for the zebrafish [J]. *Science*, 1994, 264: 699~ 703
- [31] Shinoda N, Knapik EW, Ziniti J, et al. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers [J]. *Genomics*, 1999, 58: 219~ 232
- [32] Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, et al. A detailed linkage map of mekaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution [J]. *Genetics*, 2000, 154: 1773~ 1784
- [33] Trobridge GD, LaPetra SE, Kim CH, et al. Mx mRNA expression and RFLP analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* genetic crosses selected for susceptibility or resistance to IHNV [J]. *Dis Aquat Org*, 2000, 40: 1~ 7.
- [34] Agresti J J, Seki S, Cnaan A, et al. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci [J]. *Aquaculture*, 2000, 185: 43~ 56
- [35] Tyler CR, Jobling S, Sumpter J P. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1998, 28: 319~ 361.
- [36] Sumpter J P. Xenoendocrine disrupters-environmental impacts [J]. *Toxicol Lett*, 1998, 103: 337~ 342
- [37] Livingstone DR. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment [J]. *J Chem Tech Biotechnol*, 1993, 57: 195~ 211
- [38] Afanassiev V, Sefton M, Anantachaiyong T, et al. Application of yeast cells transformed with GFP expression constructs containing the RAD54 or RNR2 promoter as a test for the genotoxic potential of chemical substances [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutat*, 2000, 464: 297~ 308

## Application of modern biotechnology on aquatic animal health cultivation

KONG Xiang-hui<sup>1,2</sup>, WANG Guizhong<sup>1</sup>, LI Shao-jing<sup>1</sup>

(1. Department of Oceanography, Institute of Subtropical Oceanography Xiamen University, Xiamen, 361005, China;

2. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, 453002, China)

**Abstract** More and more modern biotechnologies were applied extensively to aquaculture with development of molecular biology, thus great impacts were produced in the process of culture and husbandry, especially, on the healthy managements of aquatic animal culture. It was summarized for application of modern biotechnologies from diagnosis of aquatic animal diseases, preparation of high effect vaccine, breeding of anti-disease strain, improvement of anti-disease capacity and inspection of aquatic pollution, with the intention of providing helpful reference for managements of disease controls of aquaculture.

**Key words** modern biotechnology; aquatic animals; health cultivation; application