

SHUICHAN JIYINZU
JISHU YU YANJIU JINZHAN

水产基因组 技术与研究进展

孙效文 徐 鹏 等著



水产基因组技术与研究进展

孙效文 徐 鹏 等著

海洋出版社

2011 年 · 北京

图书在版编目(CIP)数据

水产基因组技术与研究进展/孙效文等著.

—北京:海洋出版社,2011.7

ISBN 978-7-5027-8027-2

I. ①水… II. ①孙… III. ①水产动物-基因组-研究 IV. ①S96

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 093143 号

责任编辑:方 菁

责任印制:刘志恒

海洋出版社 出版发行

<http://www.oceanpress.com.cn>

北京市海淀区大慧寺路 8 号 邮编:100081

北京华正印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所经销

2011 年 7 月第 1 版 2011 年 7 月第 1 次印刷

开本:787 mm × 1092 mm 1/16 印张:13.75

字数:300 千字 定价:48.00 元

发行部:62147016 邮购部:68038093 总编室:62114335

海洋版图书印、装错误可随时退换

作者列表(按姓氏笔画排序)

王少林	University of Virginia
王 健	中国水产科学研究院 生物技术研究中心
刘 红	Auburn University 华中农业大学
孙效文	中国水产科学研究院 生物技术研究中心 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所
闫学春	中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所
何舜平	中国科学院 水生生物研究所
张 洋	Texas A & M University
张 研	中国水产科学研究院 生物技术研究中心
张晓军	中国科学院 海洋研究所
李炯棠	中国水产科学研究院 生物技术研究中心
沙珍霞	中国水产科学研究院 黄海水产研究所
邹曙明	上海海洋大学
郇 聘	中国科学院 海洋研究所
赵紫霞	中国水产科学研究院 生物技术研究中心
徐 鹏	中国水产科学研究院 生物技术研究中心
童超波	中国科学院 水生生物研究所
蒋霞云	上海海洋大学
鲁翠云	中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所
赫崇波	辽宁省海洋水产科学研究院
冀培丰	中国水产科学研究院 生物技术研究中心

序 言

按照维基百科(Wikipedia)的解释,水产科学(Fisheries Science)是管理和理解渔业的学科。它是多学科交叉的科学领域,涉及到海洋学、水生生物学、海洋湖沼养护学、生态学、种群动态学、经济学与管理学等学科知识,以此提供世人对渔业的完整图景。

水产学科具有重要的战略地位,它既是农学和生物学中不可或缺的重要领域,又是维持和提升水产产业和确保人类社会和谐发展的知识基础和技术支撑。联合国粮农组织(FAO)2008年统计表明:“水产养殖继续是动物食品生产部门增长最快的产业,其增速超过人口增长,来自水产养殖的人均供应量从1970年的0.7千克增加到2006年的7.8千克,年平均增长率为6.9%。”FAO预言:“一个里程碑可能就要出现。经过稳定增长,尤其是过去40年的稳定增长,水产养殖产量将首次占全世界人类消费水产品的一半,这不仅反映了水产养殖产业的活力,还反映了全球经济的增长以及水产品加工和贸易的持续发展。”作为大农业中的重要组成部分,水产业的快速发展和人类社会对水生生物资源需求的不断增长,水产产业已经成为拉动农村经济、增加渔民收入、改善食品结构,提高人民生活水平的重要行业,在保障供给、稳定市场、保障国家粮食安全、促进贸易发展等方面都发挥了重大作用。作为以最低的谷物以换取动物蛋白的方法,水产养殖已被国际权威专家认为是世界上获取动物蛋白最有效率的技术,是中国农业对世界的重大贡献之一。

知识提升经济,技术催生产业。发展水产新技术、新设备和新品种,需要以不断的专业进展以及在生命科学、生物技术领域的技术发展为基础。水产学科既是一门设立已久的传统学科,又是一门与时俱进,与各学科交叉融合,不断充实和发展的新兴前沿学科。而水产产业是以水域生态系统和存在其中的生物资源(包括群体、个体、组织、细胞和基因)为基础,利用先进可行技术和高新技术支撑和催生的生物经济。开发新的农业产品、新型食品以及诸如可降解塑料或者新的生物燃料等新材料,是需要以不断的专业进展以及在生命科学、生物技术领域的技术发展为基础的。从水生生物资源中不仅可以获

取蛋白、食物,还可以获取药物、制品,乃至纤维、材料和能源。以知识为基础的水产业,既需要其他学科的新知识、新方法、新材料的支撑,也必将为其他学科的发展提供有力的支撑和推动。

科学指导技术的发展,技术进步促进了科学的升华。水产科学与技术从来没有像现在这样紧密结合,相互融合。进入新世纪,各种组学技术包括基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学在水生生物和生态系统中得到越来越广泛和深入的应用。海鞘(*Ciona intestinalis*, 2003)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, 2006)、星状海葵(*Nematostella vectensis*, 2007)和佛罗里达文昌鱼(*Amphioxus*, 2008)和淡水蚤(*Daphnia*, 2011)等模式生物的全基因组测序相继完成。近年来,各国政府加大了对水生重要经济生物基因资源的研究,相继取得了诸多重要进展和研究成果。美国率先启动了水生生物基因组计划,已累计投资数千万美元开展对虾、牡蛎、大马哈鱼、虹鳟、鲑鱼等水产养殖动物基因组作图和功能基因组研究,目的是筛选重要的经济性状(抗病、高产、优质)相关功能基因或分子标记,阐明这些性状的分子遗传基础。他们相继在罗非鱼、虹鳟和鲑鱼上测定了数以十万计的EST序列,筛选到大批与发育、生殖及免疫相关的功能基因。日本、加拿大、澳大利亚和挪威等国家也纷纷斥巨资,加入到海洋生物基因资源争夺战的行列。由于生命科学和生物技术的进步和发展,人类不但已从功能基因的克隆、鉴定和分析中获得了大量鉴别重要动植物品种资源的知识,而且还从基因工程和细胞工程等生物技术的创新和应用中培育出了推动农业进步的新型品种。

可喜的是我国水产科学家后来居上,迎头赶超,取得快速进展。去年以来牡蛎、半滑舌鳎和大黄鱼等基因组测序相继宣告完成,草鱼、鲤鱼、对虾等全基因组也正在进行。尤其令人欣慰的是我国一批中青年学者应运而生,他们成为现代水产科技队伍的骨干和中坚力量,其中部分脱颖而出的国内学术新秀与海外归来的优秀青年学者正在成长为该学科和技术领域的带头人。中国水产科学研究院生物技术研究中心的孙效文研究员和徐鹏博士组织近十个国内水产科研优势单位的科研骨干和一些还在海外深造的青年学子编著的《水产基因组技术与研究进展》即将问世,专著共十六章,分别对结构基因组学、转录组和功能基因研究、分子遗传与分子育种学、水产生物转基因技术等四方面做了较完整、全面的介绍。这本专著是辛勤耕耘在科研一线的我国现代水产科技发展弄潮人的科研心得与经验总结,他们对科学发展前沿具有灵敏的感触

和活跃的思维,对日新月异发展的分子生物技术有着求知若渴的兴趣和快速领会的悟性,每一章的作者对所描述的学科与技术都有切身的经历和体会,文章很值得从事水产、畜禽和其他生物科技的研究生、科技工作者和管理人员阅读。作为一个资深的水产研究人员,本人不仅先睹为快看到了这本专著的应运而生,更十分欣慰地看到我国现代水产科技创新队伍和青年才俊的茁壮成长。

中国科学院海洋研究所 相建海

2011年2月25日

前 言

近十年来,随着“人类基因组计划”的完成,以基因组研究技术为核心的各种最新的分子生物技术逐步渗透到研究相对落后的水产生物技术研究领域,水产生物技术相关的分子育种学、保护生物学、分子系统学、分子免疫学以及转基因研究等均开始应用基因组研究技术和方法,以及基因组资源推动各自领域的快速发展,水产生物技术正在进入基因组学研究的新时代。然而,我们也应该清醒地认识到,基因组学是一门多学科交叉的大科学,涉及分子生物学、遗传学、计算机科学、生物统计学、生物数学和生物信息学等多学科的专业知识,不仅发展速度极快,仪器设备、研究方法、思想和理念更新极快,而且对不同领域的协同协作要求更高。而水产生物技术领域对于基因组技术的接受和应用,由于起步较晚、经费投入不足、缺乏专门人才等各方面的原因,与重要农业作物和畜禽基因组学研究相比从深度和广度上均有较大差距。只有加强对基因组学研究技术和发展趋势的追踪学习和消化吸收,才有可能掌握快速发展的基因组学研究的脉络,拨云见日,确立研究重点,有所为有所不为,将基因组学研究技术快速应用于水产良种培育等产业急需的方向上来。

本书各章节作者均为工作在基因组学、生物信息学或者水产生物技术研究第一线的中青年科技工作者,他们来自中国水产科学研究院生物技术研究中心、中国水产科学研究院黄海水产研究所、中国水产科学研究院黑龙江水产研究所、中科院基因组所、中科院水生生物研究所、中科院海洋研究所、上海海洋大学、辽宁省海洋研究院、University of Virginia、Texas A&M University、Auburn University 等多家研究单位。经过较长时间的学习和积累,各位作者对于各自研究的领域和方向均有较深的理解,各种技术掌握全面而扎实,能够紧密跟踪本领域的最新研究进展,把握了解最新的研究动向和技术手段。我们组织各位作者撰写此书,正是为了向正在从事或即将从事水产生物分子遗传学和基因组学的研究人员和学生提供了解分子遗传学、基因组学、生物信息学和转基因研究现状、发展方向和最新技术方法的参考书。尽管本书聚焦在水产动物分子生物技术,但是同样也适合于从事畜禽、作物和园艺等领域分子遗传

学和基因组学研究的研究生,以及具有一定生物学知识,对相关研究方法和技术感兴趣的读者。

本书共十六章,分别对结构基因组学、转录组学和功能基因研究、分子遗传与分子育种学、水产生物转基因技术等四方面进行介绍。其中孙效文负责指导全书编写并参与撰写第三、四、八、九、十二、十三章;徐鹏具体负责编写组织工作并撰写第二、四、九、十章,参与撰写第八章;李炯棠撰写第八、十二章;张洋撰写第一章;张研撰写第三章;张晓军、郇聘撰写第五章;童超波、何舜平撰写第六章;王少林、刘红撰写第七章;沙珍霞撰写第十一章;鲁翠云撰写第十三章;赫崇波、王健撰写第十四章;闫学春撰写第十五章;邹曙明、蒋霞云撰写第十六章;赵紫霞参与撰写第二章;冀培丰参与撰写第十章。在编写和出版过程中得到了中国水产科学研究院领导和许多同事的大力支持,在此一并致以诚挚的感谢。

本书作者们最大的感受就是写作的过程其实也是系统梳理和学习相关知识和技术的过程,由于基因组学相关研究发展实在太快,思想和技术更新也快,本书部分内容不可避免地会有不妥或理解不到位之处,在此恳请广大读者批评指正。

孙效文 徐鹏

2010年12月于中国水产科学研究院

目 次

第一章 大片段基因组文库的构建、质量鉴定和应用	(1)
第一节 大片段基因组文库发展概述	(1)
第二节 大片段基因组文库的构建	(3)
一、HMW DNA 的制备	(4)
二、HMW DNA 部分酶切和片段选择	(5)
三、载体的制备	(8)
四、连接和转化	(9)
五、克隆的挑取与保存	(10)
六、目的克隆的筛选	(10)
第三节 文库的质量鉴定	(10)
一、文库插入片的平均大小和基因组覆盖率	(10)
二、文库的空载率、嵌合率和细胞器 DNA 污染	(11)
三、文库的稳定性检测	(12)
第四节 大片段基因组文库的应用	(13)
一、基因和数量性状位点(QTL)的图位克隆	(13)
二、基因组物理图谱的构建	(13)
三、全基因组测序	(14)
四、功能基因组分析	(14)
五、比较基因组学研究	(14)
第五节 大片段基因组文库在水产生物基因组研究中的应用和展望	(15)
第二章 物理图谱构建技术及其在水产生物基因组研究中的应用	(20)
第一节 物理图谱构建技术	(20)
一、黏粒文库酶切指纹制备	(20)
二、BAC 文库酶切指纹图谱的制备	(20)

三、物理图谱的装配	(22)
四、物理图谱的验证策略	(26)
第二节 物理图谱在基因组学研究中的应用	(27)
一、物理图谱与遗传图谱的整合	(27)
二、基于物理图谱的全基因组测序策略	(30)
三、重要基因的图位克隆	(31)
四、基于物理图谱的比较基因组学研究	(31)
第三节 物理图谱构建技术最新进展	(31)
第四节 高信息含量 BAC 酶切指纹图谱采集实验流程	(32)
一、BAC 克隆 DNA 提取实验流程	(32)
二、HICF 技术流程	(32)
第三章 水产生物遗传作图	(35)
第一节 作图群体的选择	(35)
一、亲本的选择	(36)
二、分离群体类型的选择	(36)
三、群体大小的选择	(38)
第二节 干涉和作图函数	(38)
一、干涉	(38)
二、作图函数	(39)
第三节 F_2 、BC 和 DH 群体标记位点间重组率的估算	(40)
一、两个标记位点间重组率的估算	(40)
二、多位点连锁分析方法和排序	(42)
三、基因型分型错误率及缺失率对连锁图谱的影响	(43)
第四节 远缘杂交群体的连锁分析	(43)
一、全同胞家系分离标记的特点	(43)
二、拟测交策略	(44)
三、构建 F_1 群体遗传连锁图谱的统计分析步骤	(45)
四、构建 F_1 群体遗传连锁图谱的软件	(45)
第五节 遗传图谱整合	(46)
一、分子图谱之间的整合	(46)
二、物理图谱和连锁图谱整合	(46)

第四章 全基因组测序:水产生物基因组资源的全面开发	(50)
第一节 DNA 测序技术	(50)
一、第一代测序技术	(51)
二、第二代测序技术	(52)
第二节 全基因组测序策略	(56)
一、分级鸟枪法测序策略	(56)
二、全基因组鸟枪法测序策略	(57)
第三节 应用第二代测序平台开展全基因组测序	(58)
一、应用第二代测序技术的全基因组鸟枪法测序	(58)
二、图谱在全基因组测序中的重要作用	(59)
第四节 鲤鱼全基因组测序策略	(60)
第五章 荧光原位杂交作图	(62)
第一节 荧光原位杂交技术的产生与发展	(62)
第二节 荧光原位杂交技术的基本方法和要点	(62)
一、染色体片的制备和保存	(63)
二、探针制备	(63)
三、探针与靶序列的变性和杂交	(65)
四、杂交后的洗脱	(66)
五、杂交信号的检测和观察	(67)
六、其他需要注意的要点	(69)
第三节 荧光原位杂交操作过程(以栉孔扇贝的 BAC-FISH 为例)	(71)
第四节 荧光原位杂交作图	(72)
第五节 荧光原位杂交及荧光原位杂交作图的应用	(74)
一、在基因定位上的应用	(74)
二、在构建细胞遗传图谱以及图谱整合上的应用	(75)
三、在染色体鉴别研究上的应用	(76)
四、在起源进化分析上的应用	(77)
五、在转基因和育种上的应用	(77)
第六节 荧光原位杂交及荧光原位杂交作图技术发展趋势及展望	(78)
一、一些特殊的 FISH 技术用于作图	(78)

二、水产动物 FISH 作图展望	(81)
第六章 系统发育基因组学	(87)
第一节 系统发育推断方法	(88)
第二节 基于 DNA 序列构建系统发育树的过程	(88)
第三节 基于全基因组特征构建系统发育关系	(90)
第四节 展望	(91)
第七章 比较基因组学在水产生物基因组学研究中的应用	(94)
第一节 比较基因组学在基因组结构研究中的应用	(95)
一、斑点叉尾鮰和斑马鱼之间的比较基因组学研究	(95)
二、罗非鱼和河鲢、青鲈、三刺鱼之间的比较基因组学研究	(99)
第二节 基于比较基因组学的 QTL 比较与基因克隆	(99)
第三节 比较基因组学在转录组研究中的应用	(100)
第四节 比较基因组学的一些研究工具	(101)
第八章 转录组深度测序技术	(104)
第一节 背景	(104)
第二节 RNA-Seq 技术原理及测序结果输出	(105)
第三节 测序结果的分析以及对转录组的新认识	(106)
一、数据预处理	(106)
二、信息学处理	(106)
第四节 RNA-seq 要考虑的几个问题	(109)
第五节 总结与展望	(111)
第九章 生物芯片与水产生物功能基因组学研究	(115)
第一节 生物芯片的设计和制备	(115)
第二节 荧光标记、芯片杂交与图像采集	(117)
第三节 水产生物的生物芯片研究概况	(117)
第四节 实例	(118)
一、背景介绍	(118)
二、实验设计	(119)

三、实验流程	(119)
四、数据处理和分析	(120)
第五节 水产生物芯片研究展望	(120)
第十章 数字基因表达谱技术	(123)
第一节 数字基因表达谱技术的发展	(123)
第二节 主流 DGE 技术简介	(124)
一、Illumina 公司 DGE 技术	(125)
二、GenXPro 公司的 SuperTAG DGE 技术	(125)
三、nanoString technologies 公司 DGE 技术	(125)
第三节 DGE 技术在水产生物基因组学研究中的应用前景展望	(127)
第十一章 鱼类免疫功能基因研究	(129)
第一节 概论	(129)
第二节 养殖鱼类免疫功能基因的种类和进展	(130)
一、模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR)	(130)
二、细胞因子	(133)
三、补体	(134)
四、主要组织相容性复合体	(136)
第十二章 非编码 RNA	(142)
第一节 非编码 RNA 的特点	(142)
一、非编码 RNA 广泛存在	(142)
二、非编码 RNA 来源多样	(143)
三、非编码 RNA 功能多样而复杂	(143)
第二节 非编码 RNA 的调控效应	(144)
第三节 结语	(145)
第十三章 常用分子标记	(148)
第一节 以分子杂交技术为基础的分子标记技术	(148)
一、限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)	
.....	(148)

二、可变数目串联重复多态性(Variable Number of Tandem Repeats, VNTR)	(150)
第二节 基于 PCR 技术的分子标记技术	(150)
一、随机引物的 PCR 标记技术	(150)
二、特异引物的 PCR 标记	(156)
三、基于限制性酶切和 PCR 技术的 DNA 标记	(157)
第四节 基于 DNA 测序分析的分子标记技术	(160)
一、表达序列标签(expressed sequence tags, EST)标记技术	(160)
二、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)	(161)
三、拷贝数变异(copy number variation, CNVs)	(161)
第十四章 分子遗传与保护生物学	(167)
第一节 保护生物学的概念	(167)
第二节 保护生物学的研究内容及现状	(168)
一、研究内容	(168)
二、研究现状	(168)
第三节 保护生物学分子水平的研究进展	(169)
一、基于分子杂交技术的分子标记技术	(170)
二、基于 PCR 技术的分子标记技术	(170)
第四节 水产生物多样性的保护	(171)
一、DNA 分子标记在水产生物保护中的应用	(171)
二、遗传多样性研究及保护中常用基因	(172)
第五节 保护生物学发展前景	(173)
第十五章 水产动物转基因技术	(176)
第一节 转基因技术概述	(176)
第二节 水生生物转基因的方法	(177)
一、显微注射法	(177)
二、电穿孔法	(178)
三、精子载体法	(179)
四、基因枪法	(181)
五、RNA 干扰	(181)

第三节 转基因技术在水产养殖育种上的应用	(182)
第四节 展望	(183)
第十六章 鱼类转座子介导的转基因和基因捕获策略	(188)
第一节 转座子概述	(189)
第二节 鱼类转座子	(190)
一、鲑鱼睡美人	(190)
二、青鳉 <i>Tol2</i> 转座子	(191)
三、金鱼 <i>Tgf2</i> 转座子	(192)
第三节 鱼类转座子介导的转基因策略	(193)
一、鱼类 <i>Tgf2</i> 转座子左右臂的克隆	(193)
二、转基因供体质粒 p <i>Tgf2</i> -z β -action-eGFP 的构建	(194)
三、 <i>Tgf2</i> 转座酶 mRNA(5'加帽)的体外转录	(195)
四、 <i>Tgf2</i> 转座酶 mRNA 介导供体质粒在斑马鱼中的转基因效果	(196)
五、 <i>Tgf2</i> 转座酶 mRNA 介导供体质粒在银鲫中的转基因效果	(197)
第四节 鱼类转座子介导的基因捕获策略	(198)
第五节 小结	(199)

第一章 大片段基因组文库的构建、质量鉴定和应用

大片段基因组文库 (Large-insert DNA library) 包括酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome, YAC)、噬菌体 P1 衍生的人工染色体 (Bacteriophage P1-derived Artificial Chromosome, PAC)、细菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome, BAC)、二元细菌人工染色体 (Binary BAC, BIBAC)、可转化的人工染色体 (Transformation-competent Artificial Chromosome, TAC) 和传统的质粒克隆载体 (Plasmid-based Cloning Vectors, PBC) 等。大片段基因组文库由于其较大的容量、遗传稳定性和易操作性等特点而被广泛应用于人类、动植物和微生物基因组的研究中,在基因图位克隆 (Map-based Cloning)、QTL (Quantitative Trait Loci) 定位、物理图谱构建 (Physical Mapping)、全基因组测序 (Whole Genome Sequencing, WGS)、基因结构与功能分析、比较基因组学 (Comparative Genomics) 和进化等研究中起到了重要作用。

第一节 大片段基因组文库发展概述

构建基因组文库一直是进行基因组学研究的一项重要的基础性工作。历经几十年的发展,尤其是近年来新技术、新设备的发明和应用使得克隆载体的结构不断优化,插入片段的转化效率和稳定性显著提高,大片段基因组文库逐渐成为真核生物基因组研究的关键平台。

大片段基因组文库的发展过程实际上就是其克隆载体发展历程。作为第一代克隆载体的 λ 噬菌体 (Murray and Murray, 1974) 和柯斯质粒 (Collins and Hohn, 1978) 分别可以容纳 25 kb 和 45 kb 左右的外源 DNA 片段,克隆能力十分有限。而高等生物基因结构及其调控序列庞大复杂,难以作为单一片段克隆于这些载体中,因此限制了第一代克隆载体在高等生物基因组研究中的应用。

以 YAC 为代表的第二代克隆载体是在酵母染色体的基础上构建起来的,能容纳超过 1 Mb 的外源 DNA 片段 (Burke et al, 1987)。YAC 载体系统的建立满足了高等生物基因组学研究的需要,因此很快成为各种生物基因组计划中重要的克隆工具并极大地推动了基因组学的发展。生物学家利用 YAC 载体相继构建了人类 (Burke et al, 1987; Chumakov et al, 1995)、小鼠 (Nusbaum et al, 1999)、水稻 (Kurata et al, 1997; Saji et al, 2001)、拟南芥 (Schmidt et al, 1995; Camilleri et al, 1998) 等一系列重要物种的 YAC 文库。YAC 在基因组学发展史上发挥了不可替代的重要作用,但是由于其自身的一些缺陷,如嵌合、缺失和重排,转化效率低,插入片段不易提取等限制了 YAC 的大范围应用。

克隆载体发展的第三个时期是以细菌为宿主的大片段克隆载体系统,如 BAC (Shi-