

农业部海水增养殖病害与生态重点开放实验室

ANNUAL RESEARCH REPORT OF THE KEY
LABORATORY OF MARICULTURAL DISEASE AND ECOLOGY
MINISTRY OF AGRICULTURE, THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

研 究 年 报

(1999)

中国水产科学研究院黄海水产研究所

农业部海水增养殖病害与生态
重点开放实验室

研 究 年 报

(1999 年)

主 编: 赵 法 箴 王 清 印

编辑人员: 杨 丛 海 陈 松 林 黄 健
方 建 光 于 东 祥

研 究 年 报

(1999 年)

目 录

综述

海洋生物资源可持续开发利用的基础研究	唐启升	(1)
中国海洋生物资源开发保护的发展与展望	黄 健	(5)
对虾病毒检测技术的发展现状	黄 健	(10)
海洋微生物活性物质的研究概况	刘志鸿 程 力 牟海津	(19)
海洋生物技术研究发展与展望	唐启升	(24)
渔用药物的一般检验方法	李 健 宋晓玲 孙修涛 刘 萍 马向东	(27)
对虾白斑综合症病原的传播途径及其防制	杨丛海	(37)
对虾暴发性流行病的诊断和防制	史成银 杨丛海	(40)
HPLC 法研究磺胺类药物在水产动物体内的代谢和残留	王群 马向东 李绍伟	(44)

研究论文

核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒(HHNBV)	史成银 宋晓玲 黄 健 杨丛海	(49)
暴发性流行病病原对中国对虾亲虾人工感染挤兑子代影响的 PCR 检测	刘 萍 孔 杰 石 拓 刘志鸿 李 健 韩玲玲	(55)
中国对虾白斑病组织病理学研究	蔡生力 王崇明 杨丛海	(61)
PCR 法检测对虾皮下和造血器官坏死杆状病毒	夏 春 黄 健	(66)
应用双抗夹心 ELISA 法检测皱纹盘鲍致病病原——创伤弧菌的研究	王崇明 杨 冰 宋晓玲 黄 健	(69)
用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾	魏 静 陆承平 黄 健 杨丛海	(74)
The components of an inorganic physiological buffer for Penaeus Chinensis,	Huang jie Song Xiaoling Yu Jia Zhang Lijing	(79)
泥蚶幼虫滤水率和摄食率的研究	方建光 孙慧玲 匡世煥 梁兴明 牛锡端 刘志鸿 李锋	(85)
中国对虾雌虾的心率及有关影响因素的研究	孙修涛 李 健 王清印 刘德月	(90)
低盐度突变对中国对虾仔虾存活率的影响	马英杰 张志峰 马爱军 廖承义 孙 溢	(96)

环境条件对中国对虾交尾影响的试验观察.....	李 健 孙修涛 刘德月 王清印	(101)
化学物质诱导泥蚶幼虫附着变态的研究.....	方建光 匡世焕 孙慧玲 梁兴明 刘志鸿 李锋 牛锡端	(105)
两种珍稀鱼类的形态学和生态学的补充研究.....	武云飞 门强 康斌	(109)
中国对虾产卵前后卵巢的形态和结构变化.....	孙修涛 李 健 王清印 张 岩 刘德月	(114)
大菱鲆的引进和驯养试验.....	雷霁霖 刘新富 马爱军	(121)
西藏鱼类染色体多样性的研究.....	武云飞 康 斌 门 强	(127)
红鳍东方鲀体型异常的研究.....	门 强 姚善成	(134)
A method to estimate annual larval production Of Norwegian spring-spawning Atlantic herring (<i>Clupea harengus</i>).....	Liang Xingming Herman Bjorke	(137)
扇贝精液超低温冷冻保存技术的研究.....	杨爱国 王清印 孔 杰 刘志鸿 刘 萍 王如才	(143)
中国对虾遗传多样性的 RAPD 分析.....	石 拓 孔 杰 刘 萍 韩玲玲 庄志猛 邓景耀	(149)
6-二甲基氨基嘌呤诱导栉孔扇贝三倍体.....	杨爱国 王清印 孔 杰 刘 萍 刘志鸿 孙慧玲 李锋	(156)
日本盘鲍与皱纹盘鲍杂交育种技术研究.....	燕敬平 孙慧玲 方建光 张谢令 陈家彦 张春利	(163)
中国对虾幼体发育阶段维生素 A 营养需要的研究.....	梁萌青 季文娟	(169)
中国对虾幼体中肠的超微结构.....	张志峰 马爱军 于 利 廖承义	(174)
不同脂肪源对真鲷幼鱼生长、成活及体内脂肪酸组成的影响.....	高淳仁 雷霁霖	(179)
真鲷幼鱼消化道组织学研究.....	马爱军 雷霁霖	(185)
饲料中氧化鱼油对真鲷幼鱼生长、存活及脂肪酸组成的影响.....	高淳仁 雷霁霖	(189)
饲料中不同脂肪源对黑鲷幼鱼生长和鱼体脂肪酸组成的影响.....	季文娟	(197)
真鲷幼鱼 EPA、DHA 的需求量的研究.....	高淳仁 雷霁霖	(203)
肌醇对黑鲷幼鱼营养作用的研究.....	陈四清 季文娟 吕用琦 常青 潘生弟	(208)
投喂配合饲料牙鲆幼鱼养殖试验.....	陈四清 宋宗诚 刘昌玲 孙国会 曲永琪 刘瑞菊	(211)
不同添加物对对虾诱食性的影响.....	常 青	(213)
柠檬酸对鱼饲料鱼粉中矿物元素有效性的影响.....	常 青	(215)

研究简报和论文摘要

中国对虾产卵行为及精卵排放机制初探.....	孙修涛 李 健 王清印 张 岩 刘德月	(221)
对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检验...史成银 黄健 宋晓玲		(224)
栉孔扇贝受精卵减数分裂的细胞学研究.....	杨爱国 王清印 孔 杰 刘志鸿 刘 萍 李锋 王如才 姜 明	(227)
Preliminary Studies On High Stock Selection of Marine Shrimp <i>Peneaus chinensis</i>	Wang Qingyin Li Jian Kong Jie Huang Jie Yang Conghai and Zhao Fazhen	(230)
红鳍东方鲀苗种期脊椎弯曲症原因分析.....	陈 超 孙曙光 于 宏 孙中之	(232)

海洋生物资源可持续开发利用的基础研究

唐启升

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

[摘要] 本文通过对海洋生物资源可持续开发利用战略意义和影响可持续发展的主要问题的分析,提出了海洋生物资源可持续开发利用需要支持的5个方面的基础研究。

[关键词] 海洋生物资源, 可持续利用, 海水养殖, 捕捞管理, 活性物质开发

1 海洋生物资源可持续开发利用的战略意义

在即将迈入 21 世纪之时,人类面临着人口增长、环境恶化、资源短缺等问题的巨大挑战,我国首当其冲。据预测,到下一世纪 30 年代,我国人口将突破 16 亿。而目前我国耕地面积却以每年 700 万亩的速度递减。我国人口众多,人均资源相对不足,将面对世界 7% 的耕地要养活人类进 1/4 人口的现实,为了缓解这一严峻局面并满足人们日益增长的蛋白质需求,我们必须把目光转向海洋这一尚未充分开发利用的广阔疆域。海洋面积占地球表面积的 71%,我国在渤海、黄海、东海、南海等四海可管辖的水域面积也达到 300 多万平方公里,相当于我国内陆面积的三分之一,这片“蓝色国土”不仅可以为人类提供丰富的蛋白质能源,而且也是许多具有药物和保健功能特殊活性物质的巨大宝库。海洋资源与环境的特殊性,决定了海洋经济发展对科学技术,尤其是基础科学研究的依赖性。

近十几年来,我国的海洋产业得到了迅猛的发展。海洋产业已成为国民经济发展的新的增长点。据资料表明,70 年代来,海洋产业占国民经济的比重仅为 1%,80 年代

来增至 1.7%,1995 年又增至 4%,预计本世纪末占国民经济的比重将超过 5%,到 2010 年将达 10%,使我国进入世界海洋开发的前 5 名,成为海洋经济强国。

在海洋产业中,海洋生物资源的开发利用位居首位。1997 年,我国海洋水产品总产量达 2176 万吨,占世界渔业总产量的 1/5,居世界第一位。海洋生物资源开发成为大农业中发展最快、活力最强、经济效益最高的支柱产业之一,特别是海水养殖,其产量已从 1987 年的 193 万吨增加到 1997 年的 791 万吨,占海洋渔业产量的比重,从过去的 10% 左右上升到 36%,我国已成为世界海水养殖大国。目前,我国海洋渔业总产值达 1500 亿元,约占全国整个海洋产业的 50%,因此,在海洋产业大发展的 21 世纪,海洋生物资源的持续开发利用将是我国“蓝色革命”的主体。但是,我们清楚地认识到,在我国海洋生物资源开发高速发展的同时,仍然存在不少问题和困难。尤其是基础理论研究严重滞后的问题日趋突出,已成为制约今后健康、持续发展的关键因素。

2 影响可持续发展的主要问题

2.1 养殖苗种多系未经选育的野生种,遗传力减弱,抗逆性差,性状退化等问题严重

我国的海洋生物物种多样性较高,但目前养殖的品种不足 100 种。能够形成大规模养殖生产的近十几种。而且这些品种多系未经完全驯化,在养殖条件下近亲繁殖导致优良性状逐步退化,还有不少品种完全依赖于

自然亲体或苗种。

我国目前主要海水养殖种类除海带、紫菜等极少数种类进行过系统的品种选育和改良外,其他大部分,如中国对虾、扇贝、牡蛎、蛤仔等都是未经选育的野生种,特别是经过累代养殖,出现了遗传力减弱、抗逆性差、性状退化等严重问题。此外,有些名、特、优品种,如鳗鲡、鲟鱼、鲈鱼等苗种培育尚未突破技术难关,远远不能满足生产需求,严重制约了规模化、集约化养殖的发展,苗种问题已成为制约我国海水养殖业稳定持续发展的主要“瓶颈”问题之一。

2.2 病害发生日趋严重,防治技术基础薄弱

近年来,随着我国水产养殖事业的发展,病害发生日趋频繁和相当严重。震惊水产养殖业的对虾暴发性流行病,自1993年发病以来,每年给国家造成几十亿的经济损失,使我国从世界上最大的出口国变成了主要对虾进口国。其他主要养殖品种,如扇贝、鲍鱼、牡蛎、牙鲆、海带、紫菜等的病害也日趋严重,几乎形成一种不可思议的“养什么,病什么”的严重局面,近年国家和有关部门投入了大量的人力、物力、财力来协作攻关,仍是收效甚微,防治基础十分薄弱。

2.3 生态环境恶化,养殖布局缺乏有效理论依据

我国海水养殖区主要集中在海湾、滩涂和浅海,但海水增养殖水域开发利用存在两大问题,一是内湾近岸水域增养殖资源开发过度;二是10-30m等深线以内水域增养殖资源利用不足,布局不合理。10m等深线浅海面积约为1.1亿亩,利用率不到10%;10-30m等深线以内的浅海开发利用更低;滩涂面积2880万亩,已利用面积1200万亩,利用率为50%;港湾利用率高达90%以上。由于片面追求高产量高产值,忽视了长远生态和环境效益,致使局部海区开发过度,养殖量严重超出养殖容纳量,部分饵料不能被利用而变成对水体有害的污染物;有

些养殖区滥用各种抗生素、消毒剂、水质改良剂等,严重影响了水体微生态环境。另外,由于大量的工业废水和生活污水不经处理排入近海水域,直接造成近岸水域的水质恶化。由于生态环境的恶化,重点养殖水域的养殖品种生长慢、品质下降、死亡率升高已是近年水产养殖业的普遍现象。

2.4 捕捞资源过度开发利用,资源可持续管理缺乏科学支撑

过度捕捞和环境变化等,虽已被认为是导致重要渔业捕捞种类资源严重衰退,资源质量下降和数量剧烈波动的首要原因,但是,由于对海洋生物资源自身的变动规律、补充机制和资源优势种类频繁更替的原因及种间关系等重要基础问题研究甚少,难以提出切实可行的管理措施,甚至难以对资源状况和变动趋势提出正确的评价,严重地影响了海洋生物资源可持续开发利用。另外,近年虽开展多品种、多形式、多区域的资源增殖放流,但由于资源增殖理论依据不足,回捕效果年间波动甚大,难以作出科学的解释,使放流工作带有一定的盲目性,严重影响了生产性增殖放流事业的发展。

2.5 基础研究薄弱,海洋生物高新技术研究与产业发展受到影响

海洋生物学研究是发展海洋高技术,促进产业发展的基础与前提。然而,多年来我国海洋生物学基础理论研究十分薄弱甚至严重滞后。科技投入低力量分散,重点不突出。几十年来,我国海洋生物资源的开发利用主要依靠扩大投入和增加规模来取得的,其发展的局限性和负面影响越来越明显,致使遇到品种退化、抗逆性差难以控制,病害发生又难以防治,养殖环境恶化难以修复,海洋活性物质的开发利用难以深入等等。海洋活性物质的研究与开发以成为当今世界各国的研究热点,我国近年虽有长足发展,但多注重开发,忽视基础研究。海洋新药极少,利用高新技术培养和养殖产业的生物活性物质的生物资源更少。因此,加强基础研究,加

速海洋生物学技术研究迫在眉睫。

3 需要支持的海洋生物资源可持续开发利用的基础研究

3.1 主要养殖生物优良品种的基础研究

良种,是推动海水养殖持续发展的关键。实践证明在其他条件不变的情况下,使用优良品种可以增加产量 10~30%,并且可减少病害的发生,提高成活率。因此,应重点围绕主要增养殖生物品种,开展分子遗传学基础研究,包括基因图谱、优良性状基因克隆及基因结构、全基因构建及表达的研究等,并建立各种基因库。开展增养殖生物品种的营养生理特征的基础研究和发育生物学基础的研究。重点研究突破高健康抗病品种的培育技术,多倍体苗种培育技术,特定性别的苗种培育技术等,以便为大规模、多品种地开展水产增养殖,提供可靠的理论基础。

3.2 主要养殖生物病毒病的病原生态和分子流行病学研究

应从生态学、分子流行病学角度研究提示我国海水养殖生物主要病毒病的流行与环境生态、宿主生态、病原分子变异等因素之间的内在相互关系,为渔业养殖重大疾病流行预警提供依据,为生态防治技术的研究提供理论支撑。

当前,以主要海水养殖生物(如对虾、贝类和海水鱼类)为主,重点进行病毒病流行与宿主生态学关系,环境生态因素对宿主抗病毒能力的影响,主要病毒流行的病原分子基础及变异趋势,主要病毒病流行预警的可行性研究。

3.3 海水养殖系统生态调控基础研究

针对海水养殖业迫切需要解决的主要生态学问题,选择有代表性的海湾,组织生物学、水产学、海洋学、环境学等诸多基础学科,从宏观和微观进行交叉、综合、深入地开展养殖生态系统结构和功能的研究。重点

进行养殖生物生态、生理学特征研究,营养动力学与生态容纳量的研究,养殖环境生物修复及生态效应研究,养殖容量评估和生态优化与预测模型的研究。

3.4 捕捞资源可持续开发与增殖生态理论研究

海洋捕捞业在世界沿海各国仍占有极其重要的地位,我国更不例外。与此有关的产业和从业人员仍相当庞大。因此,在发展养殖业的同时,要重视捕捞业和增殖业的发展。有必要积极开展和重点支持补充量动态理论与优势种更替机制研究,生态系统健康与可持续产量模式研究,资源增殖理论与生态安全研究,以及多样性保护与可持续管理基础研究。

3.5 海洋生物及其产物生理生化特征的研究

应在深入探索主要海洋生物活性成分的形成机制和构效关系基础上,建立可持续获取技术,为新型药用和食用海洋生物资源的开发利用奠定基础。重点支持主要海洋生物活性物质的性质、功效和形成机制的研究,重要海洋生物天然产物的构效关系及增殖活性的途径,天然产物分离纯化的工程学原理,生物活性物质高效表达的分子生物学基础以及水产食品在加工、保藏过程中的品质变化机理等研究,以期尽快形成一批具有产业化和产业化前景的科技成果。

4 结 语

21 世纪即将到来,在这极其重要的时期,我们应抓住机遇,针对当前我国海洋生物资源开发利用存在的一些主要问题,围绕新品种的培育、病害、环境、资源永续利用和活性物质的提取等关键问题,在已有的研究基础上,突出重点,有效集成,运用现代科学技术的理论和研究方法,从不同的层次进行深入综合的研究,最终为解决海洋生物资源可持续的开发利用奠定坚实的基础。

THE BASIC RESEARCH OF SUSTAINABLE UTILIZATION OF LIVING MARINE RESOURCES

TANG QISHENG

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao, 266071)

Key words: mariculture, fishing and management, development of
natural products

(注：本文发表于中国科学基金)

中国海洋生物资源开发保护的发展与展望

黄 健(Huang Jie)*

摘 要

海洋生物资源开发是促进人类和平和繁荣的重要领域。中国十分重视海洋事业的发展,海洋经济发展十分迅速。1998 年中国水产养殖总产量达 3906 万吨,其中海水养殖产量 860 万吨,从海洋获取的动物蛋白已占畜禽水产动物蛋白总供给量的 1/5,显示了海洋食物生产的巨大潜力。由于过渡捕捞,渤、黄、东海区占优势地位的底层鱼类单位产量逐年下降,渔业资源的增殖放流受到了政府的重视,近十多年来,中国开展了中国对虾、梭子蟹、虾夷扇贝、魁蚶、梭鱼、牙鲆、刺参等二十余个鱼虾贝等品种的增殖放流,在放流标志、回捕率、放流效果检验等方面取得了重要的研究进展,尤其是在标志种群放流方面为放流效果检验开辟了一条可行的新路。近年来海洋生物环境研究热点为水环境富营养化和增养殖环境调控问题,增养殖生态环境的保护与改善研究取得了一系列进展,海湾生态容纳量研究成为一门新兴的重点学科。病害发生已成为整个海水养殖业发展的一大制约因素,对虾白斑病和扇贝大规模死亡是近年来对产业发展造成重大威胁的主要疾病。在 WSSV 的基础研究进展深入,在 WSSV 防治方面,通过提高宿主的抗病能力、加强病原控制、优化环境等综合技术在现阶段对虾养殖中取得了一定的预防疾病和实现产值的效果。中国在水产动物疫病检疫和健康证书方面已开始着手进行相关的立法和管理程序。“加快发展水产养殖业,稳定近海捕捞,扩大远洋捕捞”,“加强沿海水域环境和鱼类资源的保护”是中国海洋生物资源开发保护的发展方向,海洋生物资源的开发利用将会在 21 世纪得到进一步地发展。

关键词:海洋,资源放流,病害防治,进展,展望

一、中国海水养殖业的发展

海洋生物资源开发是促进人类和平和繁荣的重要领域。中国十分重视海洋事业的发展,海洋经济发展十分迅速。70 年代末,海洋产业占国民经济的比重仅为 1%,到 1995 年已增至 4%,预计到本世纪末占国民经济的比重将超过 5%,2010 年将达到 8%~10%。在中国的各类海洋产业中,海洋生物资源开发利用产值已占整个海洋产业的 50%以上,约占国民经济总产值的 2%,近 20 年年总产量平均递增率达 20%以上,创造了同期世界最高的渔业增长率,为中国水产品人均占有量超过世界人均 20 公斤的水平做出重要贡献,海洋水产业已成为中国大农业中发展最快、活力较强、经济效益较高的产业之一,在促进海洋的和平开发利用方面起到了举足轻重的作用。

1998 年中国水产养殖总产量达 3906 万吨,其中一半以上的产量来自于海洋水产品,从海洋获取的动物蛋白已占畜禽水产动物蛋白总供给量的 1/5,显示了海洋食物生产的巨大潜力。由于对虾、青蟹、扇贝、鲍鱼、海带、紫菜等一系列海产品的育苗、饲料技术、养殖技术获得了突破,沿海滩涂及近海水域的增养殖得到不断发展,使中国的海洋渔业从捕捞型向增养殖型转化的步伐越来越快,八十年代以来中国海洋水产品的产量增长主要是靠海水养殖。已形成规模养殖的有数十种生物,从结构上来说,海水养殖的 88.1%以上的产量来自于贝类,其次藻类占 5.9%左右,鱼类占 3.5%左右,虾蟹类占 2.2%左右,其它动物类占 0.3%。

近十多年来,全世界每年从海洋中获取的鱼、虾、贝、藻已达八千多万吨。由于过度捕捞和管理不力,已使海洋渔业资源呈衰退之势。在世界 15 个主要捕捞区中,有 13 个区域

* 研究员,中国水产科学研究院黄海水产研究所病害防治研究室主任。本文系与同所资源研究室郭学武助理研究员共撰。

的总捕捞量下降。联合国粮农组织估计,全世界的海洋鱼类近 70%已被过度捕捞或完全捕捞。海洋渔业资源的衰退,促使许多沿海国家大力发展海水养殖业。1995 年,全世界海水养殖业的产品销售额已超过 200 亿美元,约占整个海洋渔业销售额的四分之一。1998 年中国海水养殖面积 100 万公顷,产量 860 万吨,成为是世界海水养殖大国,其中大型海藻和扇贝的养殖产量均居世界首位,对虾养殖产量也一度居世界首位。当前生产已由原来“量的增加”向“质的提高”方面发展,依靠科技,开发优新养殖品种和加强管理成为当前中国水产养殖发展的重点。

目前全世界海洋生物资源提供了人类所需食物来源的 5%,水平才达到可开发的 3%左右,远远低于陆地农业的开发水平。海水养殖业的发展,在保护海洋自然资源的同时,提供了大量味道鲜美、营养价值高的食物,而且扩大了劳动就业,出口创汇,促进了沿海地区经济的发展。随着二十一世纪的临近,人们越来越清楚的认识到,海洋将是人类提供粮食和优质蛋白质的重要领地。农业的概念在海洋领域得到了延伸,“蓝色农业”已被作为海洋生物资源开发产业的代名词。为此,促进海水养殖业的发展,继续开发沿海滩涂和近海水域海水增养殖业,促进海水养殖业稳定高效增长,提高海洋生物资源可持续开发潜力,是二十一世纪农业科技发展的必然趋势,对于保护海洋资源,繁荣海洋经济意义重大。海水养殖是 21 世纪海洋水产业发展的重要领域。

海洋除了可向人类提供优质食品资源外,还是种类繁多、结构独特、活性特异的海洋天然产物及生物活性物质的巨大宝库。海洋活性物质开发是近几年海洋生物资源开发新兴的领域。到目前为止,世界共从海洋生物中发现了 3000 多种新结构海洋天然产物,其中 2000 多种具有各种生物活性,即生物活性物质,为 21 世纪海洋药物开发奠定了基础。但迄今真正从海洋天然产物及活性物质中开发成药物用于临床的仅 10 几种。中国运用海洋生物技术研究开发海洋生物活性物质进展较快,如蛋白及肽类海洋活性物质的基因工程、微藻等的细胞工程、海洋细菌、真菌、放线菌的发酵工程、海洋生物酶和毒素开发等均已起步,并显示出强劲的发展势头,研究前景和开发潜力已引起广泛关注。

二、中国近海渔业资源的增殖放流

近年来,中国近海专属经济区内主要经济鱼类资源,特别是在渤、黄、东海区占优势地位的底层鱼类资源大多数处于过度捕捞状态,单位产量逐年下降,渔获物组成日趋低龄化、小型化和低值化,海洋捕捞业产量持续增长受到影响,出现了资源数量和质量衰退的趋向。解决上述问题的一项生产性积极措施是通过人工增殖放流苗种的手段,优化水域生物群落结构,提高资源的质量和数量,恢复和重建退化的海洋生态系统,保持海洋生态平衡,建立资源永续利用的“生态渔业”。中国对虾是黄渤海增殖放流的主要品种,其增殖放流工作已开展了 15 年以上,积累了丰富的经验,从 1984 到 1992 年共放流中国对虾苗种 263.42 亿尾,平均回捕率在 3.5 ~ 10.3%。中国对虾移植到东海的浙江、福建沿海的放流也取得成功,已经形成初具规模的对虾野生群体。增殖效果检验、回捕率、放流苗种的规格、放流群体的移动、生长、繁殖和死亡特性、放流海区的选择、特定放流水域的生态环境和生态容量(合理放流数量)以及饵料的敌害生物与回捕率关系的研究取得了一些成果和进展。其它放流的甲壳类品种还有斑节对虾、日本对虾、长毛对虾、梭子蟹等品种。贝类底播放流自 80 年代末期就已开始在中国沿海开展,成为某些品种的主要增养殖方式,取得了显著的经济和社会效益,放流的品种主要包括虾夷扇贝、魁蚶、皱纹盘鲍、菲律宾蛤仔、文蛤、泥蚶、缢蛏、栉孔扇贝等,底播放流的回捕率较虾类高,1-3 年的回捕率达 30-50%。海蜃的放流在摸清其生活史,掌握了工厂化育苗技术,了解野生种群动态变化等基础上,自 1984 以来在黄海就开展了其增殖放流,每年放流数量平均在 2000 万个以上,回捕率为 0.82~2.56%不等,经济效益显著。鱼类的放流梭鱼、牙鲆、大黄鱼、真鲷、黑鲷、黄盖鲹、石斑鱼等,梭鱼被认为是鱼类中最为理想的增殖对象之一,渤海每年放流数量达 600-700 万尾,回捕率达到 0.05%,使梭鱼的数量明显增加,增殖效果显著。增殖放流也是刺参的主要生产方式,通过放流 1.0-2.5cm 的刺参,成活率可达 30-40%。

但海水生物资源的增殖放流也存在一些问题,如对虾放流的回捕率下降,野生群体的

补充量也大幅度下降。黄渤海对虾野生群体的补充量与放流群体回捕率的年间变化具有明显的同步性。连续多年进行的大规模苗种放流效果虽然十分显著,但却没有使亲体数量及补充量恢复和增加的迹象。贝类、海蜇和鱼类的增殖、移植也存在同样的问题。魁蚶经过苗种中间培育放流之后,跟踪过程中曾有找不到去向的事实。海蜇放流效果检验虽尤为突出,但出现增加放流数量效果却很不明朗的情况,原因何在不得而知。

围绕增值放流效果检验的研究取得了一些进展。对虾苗种放流前后在幼虾分布区内设站进行相对数量调查的方法颇具代表性;采用斑节对虾苗种作为标志群体,在渤海进行放流,回捕率远远高于标志放流的中国对虾;用不同体色海蜇作为标志群体已经在海蜇生产性放流中应用。目前还在探索移植其它种类作为标志群体的可行性,这种“特定”的标志方法可以排除机械标志引起的标志死亡或标志脱落,难被发现等原因所致误差,并为解决放流效果检验开辟了一条可行的新路。

三、海洋生物环境的生态学

随着社会生产的迅速发展,海水养殖业规模的迅速扩大和集约化养殖程度的提高,海洋生物的环境压力越来越大,所暴露出的问题也越来越受到广泛而深入的关注。中国早期的海洋环境研究主要针对工农业污染对水产资源的影响开展调查研究,近年来海洋生物环境研究热点转向水环境富营养化和增养殖环境调控等问题上。目前已完成了黄渤海各典型海湾和养殖池塘的水环境和底质环境分析,提出了对虾养殖沉积环境质量的评价标准,从渤海莱州湾的分析得出的结论是对虾养殖排水对整个湾的污染影响较小,不会对翌年春季鱼虾产卵和春末对虾育苗和放苗的水质造成大的影响,但养殖业的不合理发展会导致水环境富营养化。

近年来,由于海水增养殖系统的环境与生物之间的越来越紧密的联系,促使了海水增养殖系统生态学科的发展,增养殖生态环境的保护与改善研究取得了一系列进展,如掌握了主要有害赤潮生物及其与富营养化的关系,初步揭示了有机污染和氮磷诱发对虾发病的机理,初步研究了环境理化因子与养殖生物生理生化状态的关系,利用系统分析研究了虾池生态系统数学模型,找到了赤潮生物防治的技术措施,探索了养殖生态系统结构的优化途径,初步建立了池塘有机污染的生物降解技术等。

海湾生态容纳量研究成为一门新兴的重点学科,在该学科研究中,中国与加拿大、欧盟等开展了广泛的国际合作。通过动物滤水率、初级生产力、有机碳和无机氮收支平衡等对不同大小的栉孔扇贝及海带总养殖容量和单位面积养殖容量分别进行估算。例如,对黄海桑沟湾估算表明,该湾扇贝总养殖量尚未达到其养殖容量,但壳高 5 cm 以上的扇贝养殖密度已超过其单位面积养殖容量的 50% 左右;湾内海带养殖量已超过其养殖容量。揭示了桑沟湾海带提前腐烂、栉孔扇贝死亡率逐年升高的原因,为解决近年来扇贝大量死亡、养殖个体越来越小、产品质量逐年下降等重大生态问题提供了理论依据。提出了不同海湾类型养殖容量估算模型、生态环境优化措施和养殖模式,为解决目前养殖业中出现的养殖个体小型化、死亡率升高、效益下降等重大生态问题提供了解决依据。经一定规模的推广实验认为切实可行,对养殖生产具有重要指导意义。

四、中国海水增养殖病害问题及其防治进展

病害是困扰世界各国海水养殖业发展的重要瓶颈,中国在海水养殖业飞速发展的背后,也受到了病害的严重困扰,自 1993 年以来,中国 70% 以上的对虾养殖面积遭受对虾白斑病影响,减产 50—70%,每年的直接经济损失达 30—50 亿元;贝类病害的损失已开始跃居海水养殖业的首位,1997 年以来扇贝的大规模死亡连年发生,趋势越来越严重,1998 和 1999 年栉孔扇贝的死亡率在山东部分海区较严重;工厂化养鲍在 1995 年以前形势喜人,北方沿海不断兴建和扩建养鲍厂及鲍鱼池,随后鲍鱼病害在各地的蔓延,使养鲍业受到了严重打击,目前大多数养鲍厂已经倒闭停业;其他贝类如文蛤、牡蛎、缢蛏等的病害也对养殖业形成了严重冲击;正在兴起的海水鱼类网箱养殖业还未在全国充分推广,也在许多品种如牙鲆、欧鳗、真鲷、鲈鱼等品种中出现了不同程度的病害的威胁。到目前为止,在海水养殖业的各品种中,几乎已找不出不受病害严重威胁的品种,由此可见,病害的发生已成为整个海水养殖

业发展的一大制约因素。

作为一个发展中国家,当前中国的整个海水养殖业在许多方面距离现代化、先进性上有一定差距,因此水产病害的发生和流行实难避免,在水产养殖业飞速发展的背后,存在一系列问题。如养殖苗种与亲体的国内地区间交流,每年的人工苗种的增殖放流,种苗的进口和引进,所有这些种苗的人工迁移均没有经过严格的检疫;病害防治的研究基础不足及防治技术缺乏,研究工作与养殖业发展需求之间有较大差距;化学药物不正常使用,造成正常生态平衡破坏、抗药性微生物与病毒性疾病暴发;海湾水域超规模养殖造成海带、扇贝等大规模死亡;养殖种苗未经驯化并大量依赖野生种群,养殖品种的抗逆性较差;滩涂养殖发展缺乏宏观控制造成海岸带生态环境恶化;在集约化养殖条件下,缺乏健康管理,高密度、水质污染、病原传播、气候突变、水体富营养化,饲养管理不当等等。上述各种问题都为病害的扩大和绵延创造了条件,是导致近年来疾病绵绵不断、愈演愈烈的原因。

中国在对虾病害研究方面进展较为突出,在 WSSV、HPV、MBV 等研究方面处于国际先进水平。1993 年就完成了 WSSV 的病原分离鉴定,随后在病毒传播途径、检测技术等方面取得了重要进展,核酸探针、PCR 等病毒的分子生物学检测技术已实现了商品化,WSSV 的基因组测序的进展也较为显著:早在 1990 年就对对虾弧菌进行了初步的疫苗研制和免疫研究,近年来,已初步明确了对虾免疫的机制,掌握了几种非特异性免疫生理指标,还开展了多糖类免疫活性物质的研究,其中几种多糖类产品作为免疫增强剂已初步推向市场;在对虾病毒病暴发猖獗的地区,通过应用免疫技术、优质饲料、生态环境优化和稳定技术提高宿主的抗病能力,同时在苗种、病原、环境等方面加强病原控制以减少感染机会,采用增氧机、蓄水式养殖等综合技术在现阶段对虾养殖中取得了一定的预防疾病和实现产值的效果;中国对虾高健康选育进行了连续几年的研究,选育出的群体具有一定的抗逆能力。其他种类的海水养殖生物病害防治也受到重视,建立了鲍鱼脓足病病原菌的 ELISA 检测技术,开展了扇贝大规模死亡病因的调查和多倍体品种培育,培育的三倍体栉孔扇贝产量提高 20%左右,成活率提高 50%。水产病害推广系统建立了全国性水产病害防治网络和各级病害防治中心站及基层实验室,在经验交流、病情通报、技术服务等方面发挥了重要的作用。最近,中国与 FAO 和 NACA 等国际组织就中国水产动物疫病检疫和健康证书方面进行了深入的交流,中国在这一领域已开始着手进行相关的立法和管理程序。

五、21 世纪初中国海洋生物资源开发的研究与发展展望

海洋渔业发展是重要的海洋开发行业,对于促进国际间区域和平和繁荣有着重要的贡献,因此海水养殖业的发展及其相关研究在中国一直受到政府的大力支持。到下个世纪初,中国将在海洋渔业领域建立良原种繁育中心,开发新养殖种类,培育扇贝、藻类、鱼类优良抗逆新品种;建立各类水域规模化高效持续养殖模式和示范区,掌握海湾营养动力学与营养循环规律,建立养殖容量评估预测模型和生态优化技术,掌握养殖环境生物修复技术,使生态环境系统处于良性循环状态;建立海洋专属经济区渔业资源负责任捕捞渔具渔法标准和资源可持续管理体系,开发生产性增殖放流种类,开展种群放流效果检验、放流海区生态环境、放流种群遗传特性变化及其对野生与放流群体补充量影响等基础研究,使增养殖与捕捞结构得到进一步优化;加强水产病害基础研究,健全病害检疫和检测预警系统,开发高效无毒的新型渔药和疫苗,完善防治病害的生态环境调控技术,提高养殖生物种苗的抗病力,系统地多种角度对病害潜在的威胁提供有效的监控和防治措施,在一个较长的时期内使病害防治工作适应不断发展的水产养殖业的需求,保障水产养殖业的高效持续发展;建成海洋生物活性物质高效筛选系统,开发海洋药物,使海洋生物活性物资在海洋领域形成一支重要的高科技产业。

中国政府提出“加快发展水产养殖业,稳定近海捕捞,扩大远洋捕捞”,“加强沿海水域环境和鱼类资源的保护”的发展方针,期望水产品的数量和质量得到很大程度的提高,使中国人均享用水产品数量与质量达到同期中等发达国家的水平。显然,海洋生物资源的开发利用将会在 21 世纪得到进一步地发展。

[参考文献]

- 1) 山东省科学技术委员会, 项目专家委员会, 1995—1998, 国家攀登计划 B “海水增养殖生物优良种质和抗病力的基础研究” 1994—1997 年年报。
- 2) 马绍赛, 1998, 乳山湾东流区丰水期(8月)有机物及营养盐的环境容量。海洋水产研究, 19: 33—36。
- 3) 方建光等, 1996, 桑沟湾栉孔扇贝养殖容量的研究。海洋水产研究, 17: 18—31。
- 4) 王可玲, 1998, 增养殖生物种质资源的保护。海洋科学, 4: 30—34。
- 5) 王崇明等, 1999, 应用双抗夹心 ELISA 法检测皱纹盘鲍致病病原——创伤弧菌的研究。海洋水产研究, 20: 30—34。
- 6) 王清印, 1999, 海水养殖业的持续发展与新技术革命, 自“中国农学会编, 新的农业科技革命战略与对策。”中国农业科技出版社, p662。
- 7) 农业部渔业局, 1997, 中国渔业统计年鉴。
- 8) 孙耀等, 1998, 虾塘水体中浮游植物群落特征及其与营养状况的关系。海洋水产研究, 19: 45—51。
- 9) 许木启等, 1998, 受损水域生态恢复与重建。生态学报, 18(5): 547—559。
- 10) 孟田湘, 1999, 渤海生态锥体的结构和变化。海洋水产研究, 20: 1—5。
- 11) 俞开康, 1998, 水产养殖动物健康管理技术。科学养鱼, 3: 31。
- 12) 赵振良, 1994, 渤海梭鱼放流增殖技术的研究。15: 115—124。
- 13) 唐启升, 1999, 海洋生物技术研究发展与展望。海洋科学, 1: 33—35。
- 14) 唐启升等, 1994, 山东近海魁蚶资源增殖的研究, 应用生态学报, 5(4): 396—402。
- 15) 黄捷等, 1995, 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒的精细结构、核酸、多肽及血清学研究。海洋水产研究, 16: 1, 11—23。
- 16) 曾呈奎, 相建海, 1998, 海洋生物技术, 山东科学技术出版社, 济南。pp661。

(自第十次中日韩“海洋水产资源培育科技人员研讨会”论文集, 1999.10., 东京)

对虾病毒检测技术的发展现状

黄 捷(Huang Jie)*

摘 要

随着对虾养殖业的发展,对虾病毒的危害越来越显著,人们对对虾病毒的关注也越来越多,全世界对虾养殖业中发现的对虾病毒有 16 种,对虾病毒的发现反映人们认识程度提高的同时,也反映了虾病流行引起人们的重视程度。对虾病毒病的传播与人类活动有直接的关系,MBV、TSV、WSSV 在国际上的传播说明水产生物及水产品流通领域的检疫制度不严格,将会导致水产养殖业的重大损失。现代生物技术的应用有力推动了对虾病毒检测技术的发展,国际上对主要的几种对虾病毒均开发了核酸探针、PCR 或 RT-PCR 检测技术,前后不到 5 年的时间,对虾病毒检测技术水平发生了极大的变化。中国报道了对虾 HPV、WSSV(HHNBV)、病原弧菌等的单抗或多抗 ELSIA 的检测技术,目前正在开展对虾 WSSV 的 ScFv 的研制。在对虾 WSSV 的核酸探针和 PCR 技术方面生产了试剂盒,实现了商业化应用。任何诊断和检测技术得到可靠的检测结果的前提均是要求送检样品的质量、代表性、是否具备统计学意义等方面满足要求,不同的采样方法所采集的对象具有不同的代表性。在中国养殖者对亲体、种苗和养殖期对虾的病毒检疫要求不断提高,反映了人们认识的加深。根据中国目前的研究基础和养殖业的发展,对虾病毒检测技术有很大的发展潜力。

关键词:对虾,病毒,检测技术,样品

1. 对虾病毒的种类和危害

迄今为止,全世界的对虾养殖业中发现的对虾病毒有 16 种,这些病毒分属细小病毒、杆状病毒、虹彩病毒科、呼肠孤病毒、弹状病毒、披盖病毒和小核糖核酸病毒等 7 个科。由于对虾病毒研究在世界各地均同时开展,不同的作者在不同的地区分离到的同种或同类病毒被给予了不同的名称,因此从病毒的名称来看,似乎病毒的种类多于 14 种。(表 1)

表 1. 对虾病毒的种类名称

	DNA 病毒
(1)杆状病毒科	
• 白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV) (Lightner, 1997)	
皮下及造血组织坏死杆状病毒(Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus, HHNBV) (黄捷, 1993)	
日本对虾的棒形病毒(Rod shaped virus of <i>Penaeus japonicus</i> , RV-PJ) (Takahashi, 1994)	
白斑病杆状病毒(White spot baculovirus, WSBV) (Chen, 1995)	
系统性外胚层和中胚层杆状病毒(Systemic ectodermal & mesodermal baculovirus, SEMBV) (Wongteerasu-paya, 1995)	
中国对虾杆状病毒(<i>P. chinensis</i> baculovirus, PCBV) (战文斌, 1995)	
对虾棒形 DNA 病毒(Penaeid rod-shaped DNA virus, PRDV) (Inouye, 1996)	
无包埋体虾病毒(Non-occluded shrimp virus, NOSV) (Lu, 1997)	
• 中肠腺坏死杆状病毒(Baculoviral Midgut Gland Necrosis, BMN) (Sano, 1981)	
斑节对虾 C 型杆状病毒(Type C baculovirus of <i>P. monodon</i> , TCBV) (Brock & Lightner, 1990)	
• 斑节对虾杆状病毒(<i>P. monodon</i> Baculovirus, MBV) (Lightner, 1983)	
澳洲对虾杆状病毒(<i>P. plebejus</i> baculovirus, PBV) (Lester, 1987)	
• 对虾杆状病毒(Baculovirus penaei, BP) (Couch, 1974)	
• 对虾血细胞棒形病毒(Penaeid hemocyte rod-shaped virus, PHRV) (Owens, 1993)	
(2)细小病毒科	
• 肝胰腺细小病毒(Hepatopancreas parvovirus, HPV) (Lightner & Redman, 1985)	
中国对虾细小病毒(<i>P. chinensis</i> parvovirus, PcPV) (肖连春, 1995)	

* 研究员, 中国水产科学研究院黄海水产研究所病害防治研究室主任。电子邮件: aqadis@public.qd.sd.cn

- 传染性皮下及造血组织坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, IHHNV) (Lightner, 1983)
- 淋巴器官细小病毒(Lymphoid organ parvovirus, LPV) (Owens, 1991)
- (3)虹彩病毒科
 - 虾虹彩病毒(shrimp iridovirus, IRDO) (Lightner & Redman, 1993)

RNA 病毒

- (4)呼肠孤病毒科
 - 呼肠孤病毒(Reovirus, REO) (Tsing & Bonami, 1987)
- (5)弹状病毒科
 - 黄头病病毒(Yellowhead virus, YHV) (Flegel, 1995)
 - 对虾弹状病毒(Rhabdovirus of penaeid shrimp, RPS) (Nadala, 1992)
- (6)披盖病毒
 - 淋巴器官空泡化病毒(Lymphoid organ vacuolization virus, LOVV) (Bonami, 1992)
- (7)小核糖核酸病毒
 - 涛拉综合症病毒(Taura syndrome virus, TSV) (Bröck, 1995; Hasson, 1995)

分类未知的病毒

- 斑节对虾球形病毒(*Penaeus monodon* spherovirus, MSV) (陈细法, 1996)
- 一种直径 80nm 的球形病毒 (陈建华等, 1994)

从 1974 年第一种对虾病毒 BP 被美国科学家 Couch 发现开始, 人们就开始意识到对虾病毒对对虾潜在威胁的存在, 在其后的 25 年中, 随着对虾养殖业的发展, 对虾病毒的危害越来越显著, 人们对对虾病毒的关注也越来越多, 报道的病毒名称的数量有呈指数增长的趋势(图 1), 可以看到, 1994 年以来, 各研究者对 WSSV 的不同分离株就至少出现了 8 种不同的名称报道。对病毒的发现一方面反映了虾病流行引起人们的重视程度, 另一方面同时也反映了人们对疾病流行的病原的认识。对虾的病毒性疾病目前是世界性的难题, 不同的病毒在亚洲和美洲均造成了对虾养殖业的严重损失。估计 1994 年的损失量就达 301.9 亿美元(图 2)。其中亚洲以 WSSV 的危害为主, 美洲以 TSV 的危害为主。

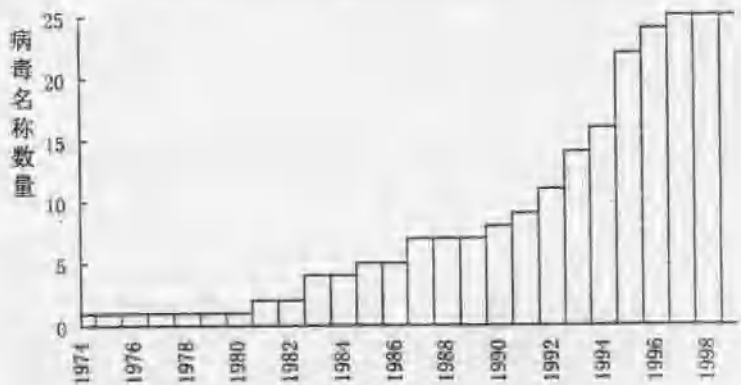


图 1. 对虾病毒名称的报道累计

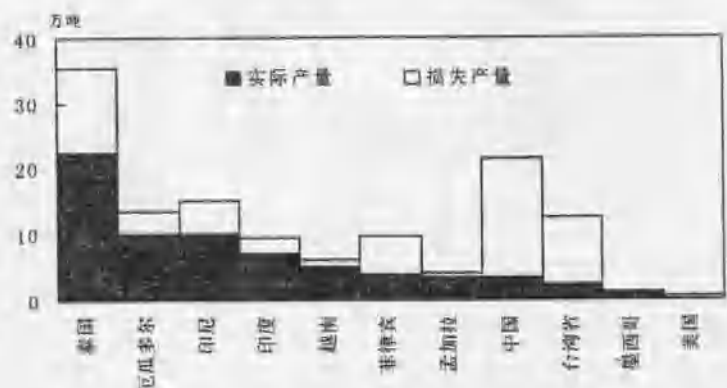


图 2. 1994 年因疾病引起的对虾养殖业的损失估计

2. 对虾病毒扩散与贸易的关系

对虾病毒病的传播与人

类活动有直接的关系, MBV 随着斑节对虾苗种的贸易而扩散到了全球范围; TSV 于 1992 年最早出现在南美最大的对虾养殖国家厄瓜多尔的 Taura 河畔, 并被认为是农药中毒而在其后的两年内未对其传播的可能性引起警惕, 随着厄瓜多尔向周边地区的对虾亲体、苗种和成虾产品的出口, 该病于 1994 年扩散到了全南北美洲, 引起了对虾养殖产业的严重损失; 从历史资料来看, WSSV 在亚洲的扩散也有类似的情况, 该病可能在 1991 年以前出现于东南亚

某地区,随着斑节对虾亲体和苗种的任意流动使该病在 1992 年蔓延到中国广东和台湾等地,并于 1993 年蔓延到整个东南亚、中国北方和日本等地,美洲由于在亲体和苗种方面与亚洲之间的交易不太频繁,并且美国对活体生物进口方面的控制较为严格,WSSV 和 TSV 在美洲和亚洲之间的传播相对较难。但 1998 年美国已出现了 WSSV 在几个虾场的暴发,美国研究者在 1996 年就查出在美国市场上的进口的对虾产品中存在有 WSSV,推测美国的养殖对虾暴发 WSSV 的途径可能有下列几条:(1)从亚洲进口发病的小对虾作鱼饵;(2)从亚洲进口有头对虾在美国去头和再包装过程中排出的废物和废水;(3)海边餐馆烹调亚洲进口的对虾排出的废物和废水;(4)越洋货船排出压舱水货船外的附着生物。由此可见,水产生物及水产品流通领域的检疫制度不严格,将会导致水产养殖业的重大损失。

3. 现代生物技术在对虾病毒检测的应用

3.1 对虾病毒检测技术的发展现状

早期的对虾病毒病的诊断是借助于组织或细胞病理学、病毒分离或活体检定(bioassay)等方法进行的,这类方法可精确地定位病毒的复制位置,揭示病变特征,展现病毒形态或证实病毒的致病性等,在对虾病毒病研究中始终占有着重要的地位,但作为诊断或检测技术应用,其过程耗时长,操作繁琐、结果重复性差、灵敏度低,在方法的实用性上存在很大的缺陷。现场诊断则借助于水浸片(Wet-mount technique)的病理观察,如 MBV 的伊红或孔雀石绿压片染色法、压片暗视野观察法、肝胰腺涂片吉姆沙染色法、T-E(台盼蓝-伊红)压片染色法等,这类方法所用仪器设备简单、操作方便、诊断成本低廉、能在 10 分钟—1 天时间内得出初步

表 2. 对虾病毒诊断及检测技术的发展现状

诊断方法	IHHNV	HPV	LPV	MBV	BMN	BP	PHRV	WSSV	IRDO	TSV	YHV	REO	LQVV	RPS	80	MSV
水浸片		R		R	R	R	R	R		R	R					
组织病理	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
电镜观察	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
病毒分离	R	R		R	R	R		R		R	R		R	R	R	
荧光抗体	R				R	R										
多抗酶联		R				R		R		R					R	
单抗酶联	R	R				R		R		R						
核酸探针	C	C		C		C		C		C	C					
(RT-)PCR	R	R	R	R		R		C		R	C					
工程抗体								R								

诊断结果,因而作为现场或快速的疾病诊断技术得到一定范围的应用,但由于方法本身是基于组织病理学原理,只能作为一种诊断技术使用,即只能对发病后的宿主进行组织细胞病理的诊断,应用范围较窄、灵敏度较低,并要求技术人员具备较强的组织病理学基础和经验。现代生物技术在医学、兽医学和生物学等方面的应用在近几十年来得到了广泛的应用,对虾病毒检测方面的起步相对较晚,1986 年 Lewis 最早应用多抗 ELISA 技术检测对虾杆状病毒(BP),90 年代初应用多抗的荧光抗体或酶联免疫技术检测对虾病毒逐渐有所报道,但上述方面多数均只限于研究,没有实现大量的商业化应用,1993 年以后,基因部分克隆对几种对虾病毒 IHHNV、MBV、BP 等取得成功,IHHNV 的核酸探针斑点杂交和原位杂交检测技术首先取得了成功,并转入商业化开发,使对虾病毒的快速检测技术的应用得到了较快的发展。随后对虾病毒的部分核酸序列得到测定,PCR 技术在对虾病毒检测方面的应用也越来越多。近年来,国际上对主要的几种对虾病毒均开发了核酸探针、PCR 或 RT-PCR 检测技术,前后不到 5 年的时间,对虾病毒检测技术水平发生了极大的变化(表 2)。

注: R 表示目前已有报道或正在研究, C 表示技术实现了商品化。

2.2 免疫学技术及其在对虾病毒检测方面的应用

免疫学检测技术建立在抗原抗体反应的基础之上,检测策略灵活性很大,某些方法在快速诊断应用方面有很大的优势。ELISA(酶联免疫吸附试验)、FIA(荧光免疫分析)、SPA(葡萄球菌 A 蛋白)絮凝试验等是目前在海水鱼虾病原检测中几种较为常用的免疫学技术,其中 ELISA 技术适用于对灵敏度较高的现场或实验室的诊断,也可用于免疫组织化学研究;FIA 多用于免疫组织化学研究;SPA 方法适用于对灵敏度要求不太高的现场快速诊断。ELISA(酶联免疫吸附测定)由于灵敏度高,操作简便,重复性好等特点,是应用最广泛的免疫学技术,其常见的检测策略有间接法和夹心法,其原理见图 3。

ELISA 间接法采用第二抗体作为酶标的桥联物,对第一抗体的结合起到了放大作用,提高了检测的灵敏度,并且由于不需要对第一抗体进行标记,只需采用商品化的酶标第二抗体,因此常在研究中应用,而对于现场快速检测,由于它的操作步骤较多、耗时较长而不太适用;



图 3. ELISA 间接法和夹心法检测原理示意图

作为商业性诊断应用,ELISA 的夹心法具有简便快捷、灵敏度高、特异性好的特点。由于酶标板上预先包被有特异性抗体,检测操作上省去了包被和封闭,并且使加入的抗原选择性地富集在酶标板上,有效地提高了检测的灵敏度,如果包被抗体和酶标抗体是针对不同的无空间位阻的抗原决定簇,检测的操作就可在两步完成。间接法通常需要在 24 小时内完成,夹心法则可缩短到 3 小时以内。多种海洋生物病原,如海水鱼类的杀鲑气单胞菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、IPNV(传染性胰脏坏死病毒)、IHNV(传染性造血组织坏死病毒)等和对虾的 BP、BMN、IHHNV、TSV、副溶血弧菌等,在国际上均有免疫检测技术的报道,其中某些免疫学检测试剂盒实现了商品化,我国也报道了对虾 HPV、WSSV(IHHNV)、病原弧菌等的 ELISA 的检测技术。除了 ELISA 技术外,FIA、SPA 絮凝、反向间接血凝检定等也在 BMN、HPV 等的研究中也偶有应用报道。

免疫学技术采用的抗体通常有两种来源,其一是抗血清(多克隆抗体),其二是单克隆抗体。近年来随着抗体分子生物学研究的深入,基因工程抗体也逐渐受到越来越多的重视,并开始应用到对虾病毒的研究方面。由于抗血清的制备周期短,对于短期的研究来说研究者通常首选抗血清,以便能尽快获得病原的检测手段。为了消除非特异性交叉反应,抗血清应用前必须经过非特异性吸收。但是对于从宿主组织纯化得到的病毒抗原,通过非特异性吸收仍然难以排除可能存在的其它病原交叉感染而产生的非特异性抗体,这样的抗血清在用于检测时,其得出的结果实质是多种病原感染的总和。因此,可靠的抗血清应来源于通过纯



图 4 单克隆抗体杂交瘤细胞株构建原理示意图

培养后的纯化抗原免疫的健康实验动物。由于对虾细胞系尚未建立,对虾病毒的纯培养无法获得,因此,在利用抗血清进行对虾病毒的检测时对其结果应做较为全面的分析。单克隆抗体来源于 B 细胞与骨髓瘤细胞融合后单克隆化的杂交瘤细胞株(原理如图 4 所示),每一个单克隆杂交瘤细胞株只产生针对一个抗原决定簇的抗体,抗体的质量与抗原来源、纯度、实验