

海洋生物技术 原理和应用

张士瑾 马军英 范晓 主编

MBT

海洋出版社

海洋生物技术 原理和应用

张士瑾 马军英 范 晓 主编

海 洋 出 版 社

1997 年·北京

图书在版编目(CIP)数据

海洋生物技术原理和应用/张士璠等主编. - 北京:海洋出版社, 1997.2

ISBN 7-5027-4225-5

I. 海… II. 张… III. 海洋生物技术原理-资源开发-应用 IV. P 745

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (96) 第 23017 号

海洋出版社 出版发行

(100081 北京市海淀区大慧寺 8 号)

海洋出版社印刷厂印刷 新华书店发行所经销

1997 年 3 月第 1 版 1997 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 18

字数: 440 千字 印数: 500 册

定价: 35.00 元

海洋版图书印、装错误可随时退换

Marine Biotechnology Principles and Applications

Editors-in-Chief

Zhang Shicui

Ma Junying

Fan Xiao

China Ocean Press

1997 • Beijing

发展海洋
生物技术
为海洋生
物资源
综合利用
作出贡献！

董：奎
96.12.21

前 言

利用微生物生产食品即所谓的生物技术的应用在我国已有悠久历史,例如酿酒业在我国至少已有4 000年历史。近二三十年来,重组DNA、基因转移、染色体操作、细胞融合和细胞固定化等新发展起来的生物技术的应用倍受人们关注。以往,人们关注的重点是微生物和陆生生物的生物技术的研究和发展。新近,我们欣喜地看到人们已经开始注意以海洋生物为对象的海洋生物技术的研究与开发了。

占地球面积71%的海洋是生命的发源地和早期生命进化的场所。海洋生物资源是人类生存和发展的宝贵财富。海洋生物资源的合理开发利用很大程度上取决于海洋生物技术的发展。我们编写的《海洋生物技术原理和应用》一书,从理论和实践两个方面对海洋生物技术各个领域的研究历史、现状和研究方法作了介绍。希望本书的出版能对普及海洋生物技术知识和我国海洋生物技术的发展及其成果转化起到一定的促进作用。

我们感谢参加本书编写工作的每位作者,感谢他们所付出的辛勤劳动。参加本书编写的人员有中国科学院海洋研究所马军英、尤锋、刘发义、严小军、范晓、吴贤汉、张士瑾、侯和胜、郭华荣、梁德海和梁世德,中国水产科学院黄海水产研究所孔杰,青岛海洋大学张耀红、郑家声和高明君以及山东大学张红卫。全书由张士瑾、马军英和范晓统一修改定稿。由于我们业务水平的限制,书中缺点和错漏在所难免,敬请读者多多指正!

张士瑾 马军英 范晓

1996年4月于青岛

Preface

Production of foodstuffs by microorganisms, i. e. application of biotechnology has a long history in China. For example, the records of the wine-making industry dates back at least 4 000 years. The application of the newly-developed techniques in the field of biotechnology such as recombinant DNA, gene transfer, chromosome manipulation, cell fusion and cell immobilization, etc. has attracted much attention in the last two decades. Previously, scientists mainly focused on research and development of the biotechnolgy of microorganisms and terrestrial organisms. Recently, the research and development of marine biotechnology, which deals with marine organisms, has aroused the interest of both scientists and the public.

The oceans which covers about 71% of the earth's surface, has been the cradle of life and the evolution site of earlier life forms. Marine organism resources constitute a great treasure-house for the livelihood and development of our humans. However, rational exploitation of marine organisms depends largely on the advance of marine biotechnology. In the present book, "Marine Biotechnology: Principles and Application", the history and trend of marine biotehnology is introduced for theoretical purposes, and the methodology presented for practical application. We hope that the publication of the book will be instrumental to popularizing, promoting, and application of marine biotechnology in our great motherland.

We are grateful to all the contributors to the book for the great efforts they have taken in writing their manuscripts. The contributors are Ma Junying, You Feng, Liu Fayi, Wu Xianhan, Fan Xiao, Yan Xiaojun, Zhang Shicui, Guo Huarong, Hou Hesheng, Liang Dehai and Liang Shide in the Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences; Kong Jie in the Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Zhang Yaohong, Zheng Jiasheng and Gao Mingjun in the Ocean University of Qingdao; and Zhang Hongwei in the Shandong University. Due to our limited knowledge, there must be some errors in the book. Criticism or correction by anyone will be greatly appreciated.

Zhang Shicui

Ma Junying

Fan Xiao

《海洋生物技术原理和应用》编委会

主 编：张士瑾 马军英 范 晓

编 委：(以姓氏笔划为序)

马军英	孔 杰	尤 锋	刘发义
吴贤汉	严小军	范 晓	郑家声
张士瑾	张红卫	张耀红	郭华荣
侯和胜	高明君	梁德海	梁世德

目 次

1 绪论	(1)
1.1 何谓海洋生物技术.....	(1)
1.2 海洋生物技术研究现状.....	(2)
2 海洋微生物的筛选和培养	(6)
2.1 概论.....	(6)
2.2 海洋微生物的采样、分离和培养技术	(7)
2.3 细菌的分类、鉴定与保存	(13)
2.4 产生 EPA 的海洋细菌的筛选	(19)
2.5 油细菌的筛选.....	(20)
2.6 海洋蓝藻的采集、分离和培养	(22)
3 海洋动物细胞的培养	(28)
3.1 概论.....	(28)
3.2 鳗鲡、鲤鱼肝细胞的培养	(28)
3.3 鳗鲡肝细胞灌流法的操作.....	(29)
3.4 分离鳗鲡肝细胞的原代单层培养法.....	(34)
3.5 振荡法分离鲤鱼肝细胞.....	(35)
3.6 分离鲤鱼肝细胞的原代单层培养.....	(35)
3.7 培养肝细胞的实验.....	(36)
3.8 草鱼肾组织细胞的原代培养和传代培养实验.....	(39)
4 大型海藻的组织培养	(41)
4.1 概论.....	(41)
4.2 组织培养的设备和技术.....	(43)
4.3 外植体的无菌化技术.....	(48)
4.4 海藻组织块愈伤组织的诱导.....	(49)
4.5 无菌培养系的愈伤组织诱导.....	(50)
4.6 细胞培养.....	(51)
5 海洋动物的细胞操作	(56)

5.1	概论	(56)
5.2	性决定(性别控制)	(59)
5.3	嵌合体动物的培育	(62)
6	大型海藻的细胞操作	(65)
6.1	概论	(65)
6.2	大型海藻的培养	(68)
6.3	原生质体分离技术	(70)
6.4	原生质体培养技术	(74)
6.5	细胞融合技术	(77)
6.6	异种融合细胞的筛选及个体再生	(82)
7	海洋微藻的细胞操作	(85)
7.1	概论	(85)
7.2	海洋微藻的分离和纯化技术	(88)
7.3	培养基	(91)
7.4	海洋微藻的生长测量和培养技术	(96)
7.5	原生质体分离技术	(100)
7.6	原生质体培养技术	(103)
7.7	细胞融合技术	(104)
7.8	细胞学技术	(105)
8	海产鱼类的染色体操作	(109)
8.1	概论	(109)
8.2	天然多倍体	(109)
8.3	人工诱导的多倍体	(111)
8.4	单性发育	(118)
8.5	染色体片断移植	(123)
8.6	染色体操作技术的应用及其发展趋势	(123)
9	海产无脊椎动物的染色体操作	(129)
9.1	概论	(129)
9.2	细胞核及染色体的观察方法	(132)
9.3	人工多倍体诱导法	(135)
9.4	多倍体的鉴定	(137)
10	海洋动物的基因克隆	(141)
10.1	概论	(141)
10.2	海洋动物的 cDNA 克隆	(143)
10.3	目的 cDNA 克隆的鉴定	(166)
10.4	DNA 序列测定	(181)

海洋生物技术工程应用

11 转基因海洋动物	(190)
11.1 概论	(190)
11.2 基因导入方法	(195)
11.3 转基因动物的鉴别	(198)
12 海洋微藻的基因工程	(200)
12.1 概论	(200)
12.2 载体的开发	(201)
12.3 受体系统	(202)
12.4 外源基因转移方法	(203)
13 大型海藻的基因工程	(208)
13.1 概论	(208)
13.2 材料的选择	(210)
13.3 大型海藻的核酸制备	(210)
13.4 大型海藻的目的基因	(211)
14 纯种保存	(213)
14.1 概论	(213)
14.2 大型藻类的纯种保存	(215)
14.3 海洋微型生物的冷冻保存	(217)
14.4 海洋植物的冷冻保存	(220)
14.5 海洋动物生殖细胞的冷冻保存	(222)
15 生物反应器	(225)
15.1 概论	(225)
15.2 微生物固定化	(226)
15.3 利用生物反应器生产有用物质	(228)
15.4 海洋蓝藻生物反应器	(231)
16 生物传感器	(235)
16.1 概论	(235)
16.2 接受器的固定化	(237)
16.3 换能器	(239)
16.4 应用	(241)
16.5 结语	(243)
17 海洋环境保护	(245)
17.1 概论	(245)
17.2 石油的生物降解	(247)
17.3 卤代烃的生物降解	(248)
17.4 酶工程方法消除工业废水中的酚与芳香胺	(250)

17.5	藻类对重金属离子的吸附·····	(253)
17.6	可降解塑料·····	(255)
17.7	生物技术在解决生物耗氧化合物对环境污染方面的应用·····	(256)
18	疾病的诊断与防治·····	(257)
18.1	概论·····	(257)
18.2	诊断·····	(258)
18.3	防治·····	(260)
19	海洋生物活性物质·····	(261)
19.1	概论·····	(261)
19.2	海洋生物活性物质的研究方法·····	(267)
20	海洋新材料——甲壳质·····	(271)
20.1	概论·····	(271)
20.2	人工皮肤·····	(272)

1 绪 论

海洋约占地球表面的 71%，总面积为 3.61 亿 km^2 。海洋的平均深度为 4 km，最深的海沟达 10 km 以上，远远超过海平面以上最高山峰的高度。浩瀚的海洋曾经是地球上生命的摇篮；今天，海洋里生存着种类繁多数量巨大的海洋生物。据估计，海洋生物有 49 个门类，至少 16 万种以上，而且许多种类为海洋所独有，如半索动物、刺皮动物、鳃足动物和栉水母等。仅就动物而言，地球上约 80% 的动物生活在海洋中，陆生动物门类和种类大大少于海洋动物。此外，海洋是一个平均压力为 380 个大气压^① 的高压世界，底栖的海洋生物一定具有独特的耐压机制。新近，人们还从海洋中还发现许多耐高温生物。海洋生物资源是人类生存和发展的宝贵财富；丰富多彩的海洋生物是人类研究和开发利用海洋生物资源的重要库源。随着陆地资源开发利用日趋达到极限，世界各国都把注意力集中到海洋生物技术的研究与开发上来。海洋生物资源的合理开发和利用很大程度上有赖于海洋生物技术或海洋生物工艺学 (Marine Biotechnology) 的研究和发展水平。

1.1 何谓海洋生物技术

著名的未来学家 John Naisbitt 在其所著的《大趋势》(Megatrends) 一书中认为：人类社会的近代史由一系列“技术时代”构成，即从化学时代(塑料)到原子时代(核能)再到微电子时代(电脑)，再接下去可能就是现在正初露端倪的生物技术时代(见 Young, 1985)。广义上讲，生物技术是利用有机体或其一部分生产各种生物制品或者为适用目的定向改良动植物遗传特性或培养具有特殊用途的微生物的技术(OTC, 1988)。生物技术是一门综合性交叉学科，其基础是生物学、化学和工程学(图 1.1.1)。按照广义的生物技术定义，海洋生物技术可以定义为利用海洋生物或其组成部分生产有用的生物产品以及定向改良海洋生物遗传特性的综合性科学技术(Attaway and Zoborsky, 1993)。

海洋生物技术兴起于本世纪 80 年代(Colwell *et al.*, 1984)，是海洋生物学一门新兴的研究领域。目前，海洋生物技术究竟应涵盖哪些研究内容还不明确。我们认为至少从狭义上讲，海洋生物技术研究的关键内容是以海洋生物为对象，综合应用基因工程、细胞操作和细胞培养等技术手段，①开发、生产和改造海洋生物天然产物以使用作药物、食品和新材料为人类服务；②定向改良海洋动植物遗传特性，为海水养殖业提供具有生长快、品质高和抗病害的优良品种；③培养具有特殊用途的“超级细菌”，用来清除海洋环境污染，保护海洋环境，或者生产具有特定生物活性的物质。随着神经生物学、海洋生态学、海洋工程学、电子学以及遥感技术和深海探测技术不断向海洋生物技术领域渗透并与之结合，预计海洋生物技术的研究范围定将日益拓宽。

^① 1 个大气压 = 101 325 Pa

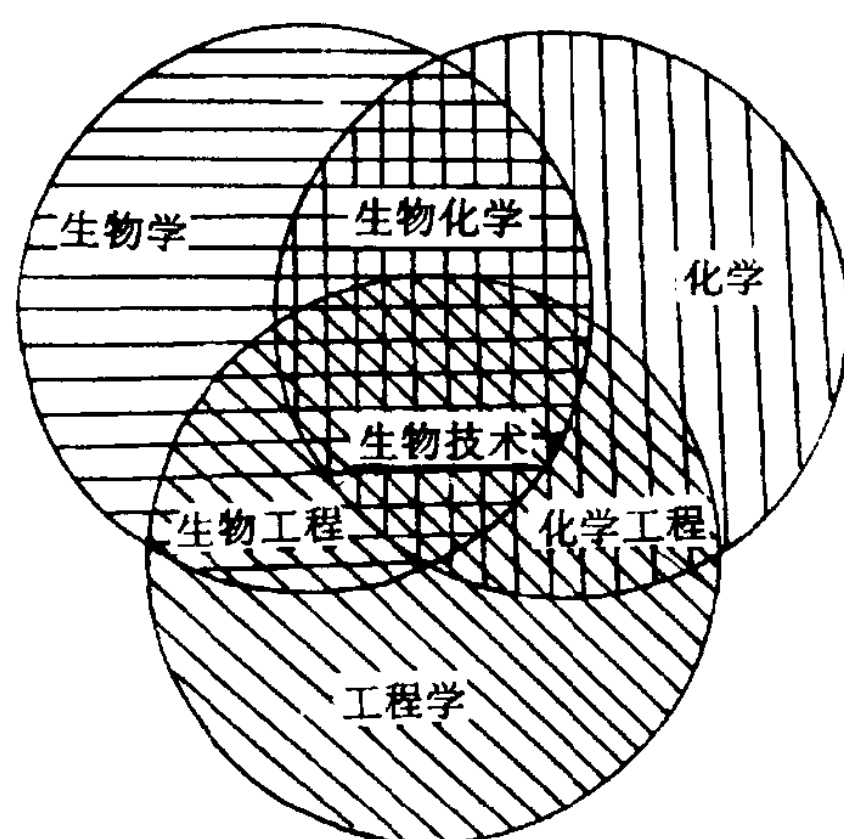


图 1.1.1 生物技术的多学科本质
(仿 Young, 1985)

1.2 海洋生物技术研究现状

近年来, 有关海洋生物技术的研究取得了不少成果, 下面分门别类略作介绍。

1.2.1 海洋动物

利用生物技术改良具有重要经济价值的海水养殖生物的遗传特性, 是海洋生物技术的主攻方向之一。美国、加拿大、英国、法国和日本等发达国家的学者将基因工程、细胞工程 and 传统技术相结合, 在海水养殖生物新品种培育方面, 业已取得明显进展。美国学者应用染色体组操作技术, 获得了雌核发育和雄核发育的虹鳟鱼; 所获得的三倍体牡蛎, 1988 年的产量占总产量的 50% 多。加拿大学者已将抗冻蛋白基因转移到鲑鱼体内, 抗冻蛋白基因不仅在受体内整合表达, 而且可通过生殖细胞(精子)传递给子代; 将生长激素基因转移到鲑鱼体内, 使转基因鱼生长速度比对照鱼提高 4~6 倍; 他们还构建了全鱼基因。英国和法国学者也都生产出转基因虹鳟鱼。日本的鱼类单性发育技术也获得很大发展。近年, 我国学者在贝类、虾类和鱼类多倍体育种方面也取得了一些可喜的成果。继用细胞松弛素 B 处理合浦珠母贝受精卵, 获得人工三倍体合浦珠母贝后, 皱纹盘鲍、栉孔扇贝、虾夷扇贝和长牡蛎的三倍体也相继研究成功; 在虾类方面, 利用温度休克和细胞松弛素 B 处理中国对虾受精卵也成功获得三倍体幼体。至今, 在我国已有十多种海洋无脊椎动物诱导三倍体获得成功, 但真正能形成规模性生产的例子还没有。至于我国海水鱼类多倍体育种的研究才刚刚起步, 目前仅进行了黑鲷和牙鲆三倍体、真鲷三倍体和四倍体以及牙鲆雌核发育的基础性研究。

近年来, 鱼类内分泌系统遗传因子的筛选与鉴定有了明显进展, 由脑下垂体分泌的生长激素(growth hormone)、促乳素(prolactin)、生长促乳素(somatoactin)、促性腺激素(gonadotropin)和垂体后叶激素(posterio pituitary hormone)的遗传因子已经分离出来, 这为研究鱼类有关激素基因的分子进化提供了重要依据。尤其值得一提的是生长激素基因, 目前已从鲑鱼、星鳎、金枪鱼、幼鲷鱼、牙鲆和鲷中分离出来, 这为人们长期期待的应用生长激素基因生产转基因鱼, 培育生长快的鱼类新品种奠定了基础。

1.2.2 海 藻

海藻可分为大型海藻和微藻两类。在大型海藻方面,已成功地从紫菜和海带中分离出原生质体并进行培养,且在此基础上,开展了细胞融合研究;大型海藻质粒的发现和开发是藻类基因工程的基础。目前,已对 20 余种红藻进行了研究,在 14 个红藻中发现了质粒的存在,这为红藻基因工程研究提供了潜在的载体。大型海藻的遗传转化是近几年发展起来的一个新领域。目前,基因 GUS 和质粒 PBI221 已被分别导入 *Kappaphycus* 和坛紫菜等,并获得瞬时表达。此外,核酸分子杂交和序列测定已广泛用来研究藻类的系统发生、亲缘关系和地理分布等。在微藻方面,淡水的小球藻和螺旋藻因生长迅速和易于培养而倍受重视,目前已经可以进行大规模生产,而且,在食品、饲料、化妆品和医药品方面被广泛利用;从微藻中分离质粒和质粒构建研究,近年来都取得了一些进展,例如从螺旋藻中分离到质粒以及将克隆的蓝藻 *Plectonema boryanum* 1.5 kb 质粒与 pBR322 构建重组质粒;有关微藻基因转移的研究近年来也取得一些进展,例如用基因枪喷射技术把带有野生型叶绿体基因的克隆化 DNA 片段导入到衣藻细胞中,并使该基因能稳定地结合到叶绿体基因组中,使发生 25 kb 删除突变的叶绿体基因组恢复原有长度和功能;再如 CaMV35S 启动子和荧光素酶基因重组体,连接到 pDO432 质粒上,转化到小球藻中成功地获得表达。

1.2.3 海洋微生物

海洋微生物广泛存在于浅海和外海水域以及深海海底等各种海洋环境中。近 20 多年来,细胞化学和分子生物学方法在微生物分类和鉴定方面的应用,使微生物的鉴定工作从经典的表型特征描述深入到遗传学特性的鉴定和细胞化学组成的精确分析,促进了微生物分类学的发展,使分类系统与真正反映亲缘关系的自然体系日趋接近。

近几年来,能产生特殊物质或具有特定生物功能的新的海洋细菌的筛选与分离取得了可喜成果。例如,从海水鱼肠道及其他海洋动物体内分离出约 500 株能产生二十碳五烯酸(EPA)的细菌。另一方面,有关石油对海洋环境的污染,正越来越引起世界各国的高度重视。自本世纪 70 年代起,美国就率先开展了利用细菌清除海洋石油污染的研究。目前,已发现约有 40 个属的细菌能够降解石油。

有关降解石油的“超级细菌”的研究是当今海洋微生物学的热点之一。随着细菌中某些烃降解质粒的发现和分子生物学技术的不断发展,使构建“超级细菌”成为可能。例如,有人将 TOL 质粒导入 TOD 降解途径中某些关键酶的基因缺陷型菌株,使 TOD 途径的一些中间产物进入 TOL 途径,从而把假单胞菌不能完全降解萘、甲苯和二甲苯混合物的两条途径即 TOD 操纵子和 TOL 操纵子途径联系起来,使之达到完全降解这类芳香化合物的目的。

1.2.4 其 他

近年来,海洋生物技术除在海洋动物、海藻和微生物方面取得上述一些主要进展之外,还在下述几方面取得一些成绩。

(1)纯种保存:随着海洋生物技术研究深入,纯系实验生物的建立和保存技术的开发已成为亟待解决的问题。海洋微生物(包括细菌、单胞藻和微小动物)的培养比较容易,其纯种保存的研究现已取得一定进展,我们期待着将来有一天能对部分海洋微生物成功地进行冷冻保存。目前,海产显花植物大叶藻的种子可用冷冻保存;大型海藻如紫菜、裙带菜和海带等经济

海藻近年来也可用继代培养的方法进行纯种保存。在海洋动物方面,目前只在鲑科鱼类中对精子细胞的冷冻保存进行过探索性研究,对其他海产鱼类和海洋动物如贝类和虾类的生殖细胞的收集保存还缺乏研究。

(2)生物反应器和传感器:生物反应器是利用生物体及其系统作为催化剂的反应系统,是连接原料和产物的桥梁。固定化酵母生产乙醇是生物反应器应用领域的典型实例,目前已完全实现工业化;利用固定化海洋蓝藻生产谷氨酸已进入试生产阶段;使用发光二极管开发高密度藻类生物反应器也已取得进展。

生物传感器是一种信号识别与处理系统,由固定化酶、细胞或细胞器等与适当的化学信号换能器件组成的生物电化学分析系统,用于微量物质的检测。有关生物传感器的研究是当前生物技术研究热点之一。目前已成功地制造出一些生物传感器,例如用双层醋酸纤维膜将硝化细菌固定化,以溶解氧探针作为换能器,已成功地制成了氨生物传感器;又例如以磷酸缓冲液控制溶液的 pH 值,以恒温水浴控制传感器的工作温度,由此制成的传感器用于废水或河水的品质监测已取得很好的效果。

(3)海洋环境保护:目前,环保技术发展十分迅速。作为一种综合技术,环保技术吸收了物理、化学和生物各门学科的研究成果,其中生物技术在环保科学上的应用虽然还不普遍,但具有广阔前景。目前,核酸探针和 PCR 技术正在发展成为一种快速可靠并可能替代常规水质分析中微生物检测的方法。在污染物和废水处理等环境净化领域采用生物技术由来已久,目前,基因工程在此领域内的应用,正朝着构建能够降解特殊化合物的微生物方向迈进;基因操作技术被用来提高某些微生物体内特异性酶类水平,而这些酶具有特异性生物降解转化作用。酶工程在环境净化领域也得以应用,例如英国用含氰化水合酶的真菌处理氰化物;美国用辣根过氧化物酶消除废水中的酚和胺;我国则利用热带假丝酵母菌处理含酚废水。最近,一种可水解对硫磷等十多种含磷杀虫剂的酶已能工业化生产,并被用于连续处理含硫磷的废水。

(4)疾病的诊断与防治:近年来,将生物技术应用于海水养殖生物的疾病诊断和防治已初见成效。核酸探针已成功运用于对虾传染性皮下组织和造血器官坏死病毒和斑节对虾杆状病毒等检测。最近,日本学者用经 PCR 合成的与神经坏死病病毒 DNA 互补的核酸探针进行杂交选择亲鱼,有效地防止了病毒性神经坏死症的垂直感染。除核酸探针外,单克隆抗体也被用来对海洋生物的疾病进行灵敏而又准确的诊断。目前,已研制出传染性胰坏死病毒、传染性造血器官坏死病毒和病毒性出血性败血病病毒等主要鱼类病毒的单克隆抗体,并用于多种鱼类及其他养殖动物病原的诊断。

(5)海洋生物活性物质:自本世纪 60 年代至今,从海洋生物中已经发现具有重要生理及药理活性的化合物达上千种,其中海洋生物毒素是研究最多取得成绩最突出的一类物质,像河豚毒素已经作为商品出售。近 20 年来,在海洋药物筛选分离方面,已从海绵、海鞘、珊瑚和海兔等海洋生物中分离得到尿核苷、酰胺类、聚醚类、萜类、大环内酯、环肽和直链肽等多种化合物,其中有些已被批准为抗癌新药或正在进行临床试验;发现海洋鱼类、贝类和藻类中含有丰富的 EPA 和二十二碳六烯酸(DHA),它们都具有降低血压、降低高脂血症患者血浆中的甘油三酯、低密度脂蛋白和胆固醇,降低血小板凝聚以及增加血凝时间等功能,已被正式批准为治疗心血管病的药物;已从海洋生物中分离出一批具有抗菌活性的物质,例如,从鲱鱼精液中提取的抗艾滋病药物 AZT 已正式用于临床。此外,还发现大量的海洋生物提取物,特别是微藻提取物或者其细胞外产物,具有抗微生物包括细菌、真菌和原生动物的活性,但这些活性成分的性质目前尚不清楚。

(6)海洋新材料:随着海洋生物技术研究开发的深入,从海洋生物中提取或制造一些具有特殊功能的新材料将越来越引起人们的重视。目前,有关甲壳质的开发利用倍受人们关注。我国和日本一些学者都在开展以甲壳质为材料研制人工皮肤的研究,已达到产品试制阶段。同时,以甲壳质作为药物粘合剂或新型缓释辅料以及用甲壳质制造人造血管和手术缝合线的研究工作都已取得很好的结果。

总而言之,近年来海洋生物技术在各个领域都取得了显著进步。我们相信,随着研究与开发的不断深入,海洋生物技术必将为人类提供更多更好的生物制品,必将为人类定向改良海洋生物遗传特性创造对人类有益优良生物品种做出应有贡献。

参 考 文 献

- Attaway D H and O R Zaborsky. 1993. Marine Biotechnology, Vol. 1, Plenum Press, New York
Colwell R R, E R Pariser and A J Sinskey. 1984. Biotechnology in the Marine Sciences, John Wiley & Sons Inc., New York
Moo-Young M. 1985. Comprehensive Biotechnology, Vol. 1~4, Pergamon Press, Oxford
OTC (Office of Technology Assessment). 1988. New Developments in Biotechnology 4: U.S. Investment in Biotechnology, Office of Technology Assessment, Congress of the United States, Washington, D. C

中国科学院海洋研究所 张士瑾 马军英