



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111280098 A

(43)申请公布日 2020.06.16

(21)申请号 202010186289.6

(22)申请日 2020.03.17

(71)申请人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市市南区鱼山路5号

(72)发明人 邢强 朱星海 彭程 陆维

黄晓婷 张玲玲 包振民

(74)专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有

限公司 37201

代理人 曾庆国

(51)Int.Cl.

A01K 61/54(2017.01)

A61B 5/0402(2006.01)

A61B 5/0205(2006.01)

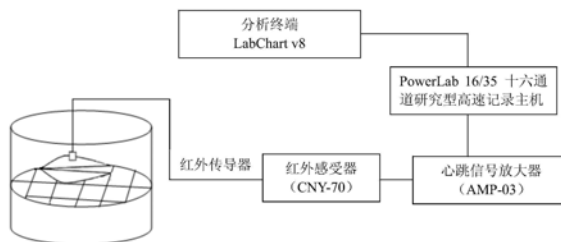
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定方法

(57)摘要

本发明建立一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定新方法,本发明的方法利用11℃的心率HR_{11℃}计算ABT,计算公式如下:ABT=-0.427xHR_{11℃}+33.159(R²=0.5028)。本发明对栉孔扇贝耐温性状ABT进行标准化、低成本、高通量测定,将获得的ABT估计值作为育种过程中亲贝选育的依据。本发明是对现有扇贝ABT测定系统进行了设备改进和测定方法改善,本发明建立的栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定方法,测定速率约为1min/个体,显著提升扇贝耐温性状ABT的测定效率(~80倍)。首次提出了基于扇贝心率指标对ABT的快速估算方法。采用本方法能够为栉孔扇贝抗逆品种的选育及抗性指标体系的建立提供研究基础。



1. 一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定方法,其特征在于,所述的方法包括如下的步骤:

1) 将连接好的扇贝心电波形检测仪器的Infrared sensors (CNY-70) 的红外感端用Valigoo GEL-10粘到待检测扇贝壳外靠近心脏的位置;

2) 在开始检测前将待测双壳贝类个体放到11℃的海水环境中,待外套膜触须充分伸展之后进行检测,收集6分钟检测时间内心跳波形图;

3) 计算每个实验扇贝个体在11℃温度下6分钟检测时间内的心率HR;分别统计前(1-2分钟),中(3-4分钟)和后(5-6分钟)三个时间段所有稳定波形的频率,计算平均值和标准差,作为每个实验个体11℃的心率 $HR_{11^{\circ}C}$;

利用11℃的心率 $HR_{11^{\circ}C}$ 计算ABT,计算公式如下:

$$ABT = -0.427 \times HR_{11^{\circ}C} + 33.159 (R^2 = 0.5028)。$$

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的心电波形检测仪器的连接方式如下:

将红外传感器Infrared sensors (CNY-70)的探头一端用Valigoo GEL-10粘到待测双壳贝类个体围心腔附近的外壳,另一接口端以RJ11连接方式接入心跳信号放大器;

心跳信号和PowerLab 16/35十六通道研究型高速记录主机两端均以BNC连接方式相互连接;

PowerLab 16/35十六通道研究型高速记录主机以USB连接方式接入电脑。

3. 一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的标准,其特征在于,所述的标准计算公式如下:

$$ABT = -0.427 \times HR_{11^{\circ}C} + 33.159; \text{其中 } HR_{11^{\circ}C} \text{ 为栉孔扇贝 } 11^{\circ}C \text{ 下的心率 } HR。$$

一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定方法

技术领域：

[0001] 本发明属于海洋生物技术领域，具体涉及一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定方法。

背景技术：

[0002] 贝类产业是我国海水养殖产业的重要组成部分，养殖产量约占海水养殖总产量的71.09% (中国渔业统计年鉴, 2019)。以扇贝为代表的贝类养殖曾引领我国海水养殖的第三次浪潮，推动了养殖产业的快速发展。栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是中国养殖最早的扇贝品种，属我国北部沿海主导贝类养殖品种。20世纪末以来，栉孔扇贝往往在夏季高温季节暴发大规模死亡，给养殖者带来巨大经济损失的同时，也制约了我国扇贝养殖业的健康发展。

[0003] 作为变温动物，扇贝等无脊椎动物的温度适应性机制一直以来都受到学者们的广泛关注，早在1929年就有关于瓣鳃纲 (*Lamellibranchiata*) 动物致死温度的研究报道，近年来在分子遗传及功能基因等方面，也开展了LEDGF、HSP70、CuZnSOD、MnSOD等耐温相关基因的克隆及表达分析的研究。双壳贝类中的研究表明，温度对其环境耐受能力和先天性免疫具有重要影响，在实际育种工作中作为重要环境因子被深入研究。但这些研究多局限在生理生化、细胞、分子、基因等相对单一的检测和分析手段，缺少准确、无损伤的双壳贝类耐温性状评价指标。

[0004] 1990年, Depledge等发明了无脊椎动物心电参数检测系统-CAPMon, 使心电参数作为一种全新、准确、无损伤的生物指标得到广泛应用。发明人所在本课题组在CAPMon系统的基础上开发和完善了扇贝心电参数检测技术, 扇贝心电波形与其心脏结构(一个心室和两个心耳)的一致性, 表明了检测仪器和技术方法的可靠性, 为进行扇贝心电参数的测定提供了方法学保证。基于扇贝心电参数测定系统, 我们进一步对温度胁迫下(10°C-37°C)的四种养殖扇贝(虾夷扇贝 *Patinopecten yessoensis*、栉孔扇贝 *Chlamys farreri*、海湾扇贝 *Argopecten irradians* 和墨西哥湾花布贝 *Argopecten ventricosus*, 48个体*每个扇贝物种)进行种间和种内个体心电参数的表达规律分析。结果显示, 扇贝心电参数心率 Heart Rate (HR) 随温度的变化呈现先逐渐上升, 到达极值又陡然下降的趋势, 此过程中HR极值对应的温度称为ABT (Arrhenius break temperatures)。温度变化过程中, 四种扇贝的ABT分别为 $22.03 \pm 0.19^\circ\text{C}$, $29.10 \pm 0.25^\circ\text{C}$, $32.20 \pm 0.25^\circ\text{C}$ 和 $34.09 \pm 0.19^\circ\text{C}$, 与已报道的各物种的实际温度耐受极限一致。结果表明, 扇贝种间个体存在耐温性状差异, 扇贝心电参数ABT能够准确、无损伤地指示各物种的温度耐受极限。此外, BLUP (Best Linear Unbiased Prediction, 最佳线性无偏预测) 方法估算结果显示6月龄、12月龄、18月龄和24月龄栉孔扇贝耐温性状ABT的遗传力分别为: 0.7822、0.8312、0.7813和0.7692, 表明ABT为高遗传力性状, 在贝类的选择育种和杂交育种中具有潜在重要的应用价值。

[0005] 如何进行贝类性状的高通量精准测定, 实现对遗传效应(育种值)的准确估计, 是建立高效、健康、绿色的育种技术体系的关键。对于扇贝耐温性状指标ABT, 现阶段的测定步骤主要包括: 1) 仪器和设备的连接; 2) 将Infrared Sensors (CNY-70) 的红外感端粘到扇贝

壳外靠近心脏的位置(背部围心腔中);3)升温过程中(10-37℃)每个整数温度点的扇贝心率HR测定;4)运用线性回归估算ABT等。但上述方法的测定步骤繁琐、周期长,难以实现高通量快速测定。限速步骤主要分为以下两方面:测定设备方面,八通道研究型高速记录主机(含LabChart Pro专业版)测定端口较少(只有8个input通道);将Infrared Sensors(CNY-70)的红外感端粘到扇贝所用的Blu-Tag型胶,粘贴过程较慢,疏水性和牢固性较差,实验过程容易脱落。测定方法方面,需要连续记录并计算实验扇贝个体10-37℃每个整数温度点的心率(升温速度0.2℃/min,每个整数温度点至少恒定5min,共需要280min,即40min/个体),根据心率随温度的变化趋势(HR先逐渐上升,到达极值后又陡然下降),运用线性回归方法计算ABT(每个温度点HR计算以及运用线性回归方法估算ABT时间约40min/个体)。目前的ABT测定方法速度慢、通量低,并且操作过程短时间的高温胁迫可能会对扇贝个体造成一定的损伤。性状的标准化高通量测定是扇贝全基因组选择育种的关键步骤,但迄今为止扇贝中尚未建立ABT的快速、准确、高效的测定方法。

发明内容:

[0006] 本发明的目的是建立一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定新方法,在不伤害育种扇贝机体活性的基础上,大幅度提高ABT的测定效率(~80倍),实现对测定个体ABT的快速、准确、高效的无损伤测定,以弥补现有技术的不足。解决现阶段海产经济贝类养殖过程中缺少耐温性状ABT的标准化高通量测定的问题,从而使ABT作为性状指标,就如同壳高、壳长、壳宽、体重等体尺性状,应用于扇贝的全基因组选择育种工作中。

[0007] 本发明所提供的栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定方法,包括如下的步骤:

[0008] 1)将连接好的扇贝心电波形检测仪器的Infrared sensors(CNY-70)的红外感端用Valigoo GEL-10粘到待检测扇贝壳外靠近心脏的位置(背部围心腔附近);

[0009] 2)在开始检测前将待测双壳贝类个体放到11℃的实验海水环境中,待外套膜触须充分伸展之后进行检测,收集6分钟检测时间内心跳波形图;

[0010] 3)计算每个实验扇贝个体在11℃温度下6分钟检测时间内的心率HR;分别统计前(1-2分钟),中(3-4分钟)和后(5-6分钟)三个时间段所有稳定波形的频率,计算平均值和标准差,作为每个实验个体11℃的心率HR_{11℃};

[0011] 利用11℃的心率HR_{11℃}计算ABT,计算公式如下:

[0012] $ABT = -0.427 \times HR_{11℃} + 33.159$ ($R^2 = 0.5028$);

[0013] 其中心电波形检测仪器的连接方式如下:

[0014] 将红外传感器Infrared sensors(CNY-70)的探头一端用Valigoo GEL-10粘到待测双壳贝类个体围心腔附近的外壳,另一接口端以RJ11连接方式(6个位置/6针模块化的插孔或插头)接入心跳信号放大器Heartbeat monitor amplifier(AMP-03);

[0015] 心跳信号放大器Heartbeat monitor amplifier(AMP-03)和PowerLab 16/35十六通道研究型高速记录主机(含LabChart Pro专业版)两端均以BNC连接方式相互连接;

[0016] PowerLab 16/35十六通道研究型高速记录主机(含LabChart Pro专业版)以USB(Universal Serial Bus,通用串行总线)连接方式接入电脑(安装LabChart v8 for Windows)。

[0017] 本发明还提供一种栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定的标准,所述标准如下:

根据栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 11℃ 下的心率 HR, 个体 ABT 的快速计算公式为 $ABT = -0.427 \times HR_{11^\circ C} + 33.159$ 。

[0018] 本发明对栉孔扇贝耐温性状 ABT 进行标准化、低成本、高通量测定, 将获得的 ABT 估计值作为育种过程中亲贝选育的依据。本发明对现有扇贝 ABT 测定系统进行了设备改进和测定方法改善, 显著提升扇贝耐温性状 ABT 的测定效率 (~80 倍), 本发明建立的栉孔扇贝耐温性状指标 ABT 的快速测定方法, 测定速率约为 1min/个体 (采用 PowerLab 16/35 测定 16 枚扇贝个体 ABT 的测定时间约为 16min)。首次提出了基于扇贝心率指标对 ABT 的间接、快速估算方法。采用本方法能够为栉孔扇贝抗逆品种的选育及抗性指标体系的建立提供研究基础。

附图说明:

[0019] 图1: 栉孔扇贝 ABT 测定系统模式图;

[0020] 图2: 栉孔扇贝心电参数测定现场图, 其中栉孔扇贝心电参数测定现场图 (左) 和心跳波形图 (右);

[0021] 图3: 栉孔扇贝各温度下心率 HR 与 ABT 相关性散点图 (N=108)。

具体实施方式

[0022] 本发明通过对现有扇贝 ABT 测定系统设备的改进和测定方法的改善, 显著提升扇贝耐温性状 ABT 的测定效率, 建立一种栉孔扇贝耐温性状指标 ABT 的快速测定新方法, 实现标准化、低成本、高通量测定, 为扇贝的选择育种工作提供可靠的技术手段。

[0023] 基于心率 $HR_{11^\circ C}$ 的 ABT 快速估算能够实现扇贝耐温性状的准确、高通量和无损伤测定; 申请人在长期的研究中发现栉孔扇贝的 ABT 与 $HR_{11^\circ C}$ 具有较好的负相关关系 (Pearson $r = -0.710, P < 0.001$), 线性回归公式为: $ABT = -0.427 * HR_{11^\circ C} + 33.159$ ($R^2 = 0.5028$), 可以作为栉孔扇贝耐温性状指标 ABT 的快速估算方法。

[0024] 本发明方法的步骤如下:

[0025] 实验所用扇贝个体从自然生存环境转移到实验室适宜条件, 将实验个体外壳的附着物清除干净, 放在实验条件下 5~7 天使其适应实验环境;

[0026] 1、扇贝心跳检测仪器的连接:

[0027] 1) 红外传感器 Infrared sensors (CNY-70) 的探头一端用 Valigoo GEL-10 粘到待测扇贝个体围心腔附近的外壳, 另一接口端以 RJ11 连接方式 (6 个位置/6 针模块化的插孔或插头) 接入心跳信号放大器 Heartbeat monitor amplifier (AMP-03);

[0028] 2) 信号放大器 Heartbeat monitor amplifier (AMP-03) 和 PowerLab 16/35 十六通道研究型高速记录主机 (含 LabChart Pro 专业版) 两端均以 BNC 连接方式 (BNC, Bayonet Nut Connector-刺刀螺母连接器, 是一种用于同轴电缆的连接器) 相互连接;

[0029] 3) PowerLab 16/35 十六通道研究型高速记录主机 (含 LabChart Pro 专业版) 以 USB (Universal Serial Bus, 通用串行总线) 连接方式接入电脑 (安装 LabChart v8 for Windows)。

[0030] 2、扇贝心跳检测方法的标准化:

[0031] 1) 将实验扇贝外壳的附着生物清除干净, 放在 11℃ 条件下 5-7 天使其适应实验环

境,稳定心跳;

[0032] 2) 将Infrared Sensors (CNY-70) 的红外感端用Valigoo GEL-10粘到扇贝壳外靠近心脏的位置(背部围心腔中);

[0033] 3) 检测之前10分钟,将待测扇贝个体放到充气的5L的11℃的实验海水环境中,待外套膜触须充分伸展之后,仪器连通进行检测。在实验结束后,实验个体放回实验前的水体环境中。

[0034] 3、数据分析:

[0035] (1) 截取11℃条件下6分钟检测时间栉孔扇贝心跳波形图中波形稳定的区域,图像中应能够明显区分扇贝一个心室的波形(短而高的波峰)和两个心耳的波形(长而平的波峰);计算11℃条件下前(1-2分钟),中(3-4分钟)和后(5-6分钟)三个时间段所有稳定波形的频率,计算平均值和标准差,作为每个实验个体11℃的心率 $HR_{11^{\circ}C}$;

[0036] (2) 采用发明人先前获得的108枚栉孔扇贝个体在11℃温度下6分钟检测时间内的心率HR数据;分别统计前(1-2分钟),中(3-4分钟)和后(5-6分钟)三个时间段所有稳定波形的频率,计算平均值和标准差,作为每个实验个体11℃的心率 $HR_{11^{\circ}C}$;大样本数据统计结果显示:栉孔扇贝ABT与 $HR_{11^{\circ}C}$ 具有较好的负相关关系(Pearson $r=-0.710, P<0.001$),进一步获得线性回归方程,即ABT的计算公式如下: $ABT=-0.427*HR_{11^{\circ}C}+33.159 (R^2=0.5028)$,计算每个扇贝个体的ABT。

[0037] 下面以快速测定获得的ABT为指标评价,对栉孔扇贝进行耐温能力评估为例详细叙述本发明的方法。

[0038] 实施例1

[0039] 1、扇贝心跳检测仪器的连接:

[0040] (1) Infrared Sensors (CNY-70) 的接口端以RJ11连接方式接入Heartbeat monitor amplifer (AMP-03);

[0041] (2) Heartbeat monitor amplifer (AMP-03) 和PowerLab 16/35十六通道研究型高速记录主机(含LabChart Pro专业版)两端均以BNC接口相互连接;

[0042] (3) PowerLab 16/35十六通道研究型高速记录主机(含LabChart Pro专业版)

[0043] 以USB连接方式接入电脑(安装LabChart v8 for Windows)。

[0044] 2、扇贝心跳检测方法的标准化:

[0045] (1) 将实验扇贝($N \geq 18$,大小相似,具有不同的遗传背景)外壳的附着生物清除干净,放在实验条件下暂养5-7天,使其适应实验环境,稳定心跳;

[0046] (2) 将Infrared Sensors (CNY-70) 的红外感端用Valigoo GEL-10粘到扇贝壳外靠近心脏的位置(背部围心腔中);

[0047] (3) 实验之前10分钟将上述扇贝放到11℃充气的5L的实验海水水体环境中,待外套膜触须充分伸展之后,进行检测。

[0048] 3、数据分析:

[0049] (1) 截取11℃条件下6分钟检测时间栉孔扇贝心跳波形图中波形稳定的区域,图像中应能够明显区分扇贝一个心室的波形(短而高的波峰)和两个心耳的波形(长而平的波峰);计算11℃条件下前(1-2分钟),中(3-4分钟)和后(5-6分钟)三个时间段所有稳定波形的频率,计算平均值和标准差,作为每个实验个体11℃的心率 HR_i (表1);

[0050] (2) 采用已获得的大样本 ($N > 100$) 数据分析结果: 栉孔扇贝 ABT 与 $HR_{11^{\circ}C}$ 具有较好的负相关关系 (Pearson $r = -0.710, P < 0.001$), 进一步获得线性回归方程, 即 ABT 的计算公式如下: $ABT = -0.427 * HR_{11^{\circ}C} + 33.159 (R^2 = 0.5028)$, 计算每个扇贝个体的 ABT_i (表1)。

[0051] 4、ABT快速测定新方法的评价:

[0052] 将上述18枚栉孔扇贝检测个体转移到温度为该物种 ABT ($29^{\circ}C$) 的水体环境中, 观察每只虾夷扇贝心率出现显著性差异 (心律不齐或者心跳骤停) 的时间 (耐受时间) T_i (表1)。

[0053] 表1栉孔扇贝不同个体 ($N = 18$) $11^{\circ}C$ 的心率 HR_i 、估算 ABT_i 和实际耐受时间 T_i 统计表

[0054]

栉孔扇贝 a_i	HR_i (bpm)	ABT_i ($^{\circ}C$)	T_i (min/s)
a_1	10.71	28.57212	13min36s
a_2	9.29	29.08588	14min 48s
a_3	9.04	29.17633	14min12s
a_4	8.25	29.46215	14min 30s
a_5	10.69	28.57936	13min 36s
a_6	9.07	29.16547	14min 12s
a_7	9.63	28.96287	14min 0s
a_8	9.84	28.88689	13min 54s
a_9	10.25	28.73855	13min 48s
a_{10}	12.73	27.84129	12min 54s
a_{11}	14.38	27.24432	12min 24s
a_{12}	10.71	28.57212	13min 36s
a_{13}	10.42	28.67704	13min 42s
a_{14}	11.11	28.42740	13min 30s
a_{15}	12.96	27.75807	12min 48s
a_{16}	11.03	28.45635	13min 30s
a_{17}	12.73	27.84129	12min 54s
a_{18}	13.83	27.44331	12min 36s

[0055] 实验结果显示, 栉孔扇贝 ($N = 18$) $11^{\circ}C$ 的心率 HR_i / ABT_i 与实际耐受时间 T_i 的 Pearson 相关性指数 r 高达 0.970 ($P < 0.001$), 显示了栉孔扇贝耐温性状指标 ABT 的快速测定新方法的准确性。

[0056] 应用本发明方法, 随机选择 320 枚二龄栉孔扇贝个体 (取自青岛市崂山区沙子口海区), 在 $11^{\circ}C$ 下测定其心率, 并根据本方法中的回归方程 $ABT = -0.427 * HR_{11^{\circ}C} + 33.159$ 估算每个扇贝个体的 ABT_i ; 做好标记后海上笼养, 跟踪统计海上养殖过程中其死亡率, 以验证本发明方法在扇贝育种工作中的应用。实验中, 选取 320 只二龄栉孔扇贝 ABT_i 排名前 30% (组1, $n = 96$ 只) 和后 30% (组2, $n = 96$ 只) 的个体分别装笼海上暂养, 定期统计各组死亡率 (表2)。

[0057] 表2: 依据 $HR_{11^{\circ}C}$ 指标二龄栉孔扇贝 ABT_i 排名前 30% (组1, $n = 96$ 只) 和后 30% (组2, $n = 96$ 只) 的海上笼养死亡率统计

[0058]

分组	数目	死亡率 (%) -30天	死亡率 (%) -60天	死亡率 (%) -180天
组1	96	5.31 ± 0.53	13.42 ± 4.62	28.48 ± 5.11

组2	96	16.73±2.36**	28.03±4.25**	42.23±8.33**
----	----	--------------	--------------	--------------

[0059] 以上结果显示,组1和组2各96只二龄栉孔扇贝在测定11℃的心率放到海上笼养之后,30天、60天和180天死亡率的组间比较均为组2高于组1,且组间具有极显著差异(T检验, $P<0.001$),验证了栉孔扇贝耐温性状指标ABT的快速测定新方法的可靠性。为了更好的验证本发明方法的准确性,2019年3月在烟台海益苗业有限公司育苗车间内实验。对不同批次,相同养殖方式的栉孔扇贝进行 $HR_{11^{\circ}C}$ 指标的测定,同时统计生产后亲贝的死亡率和幼苗成活率。结果表明,通过 $ABT = -0.427 * HR_{11^{\circ}C} + 33.159$ ($R^2 = 0.5028$)估计的栉孔扇贝ABT较高的个体,亲贝的死亡率和后代成活率均具有显著优势。结果表明本发明的ABT的快速测定新方法,可以实现栉孔扇贝耐温性状的标准化的、低成本、高通量的快速测定,从而为扇贝抗逆性状的全基因组选育提供有效的实验方法,为我国扇贝的高质健康养殖提供技术支撑。

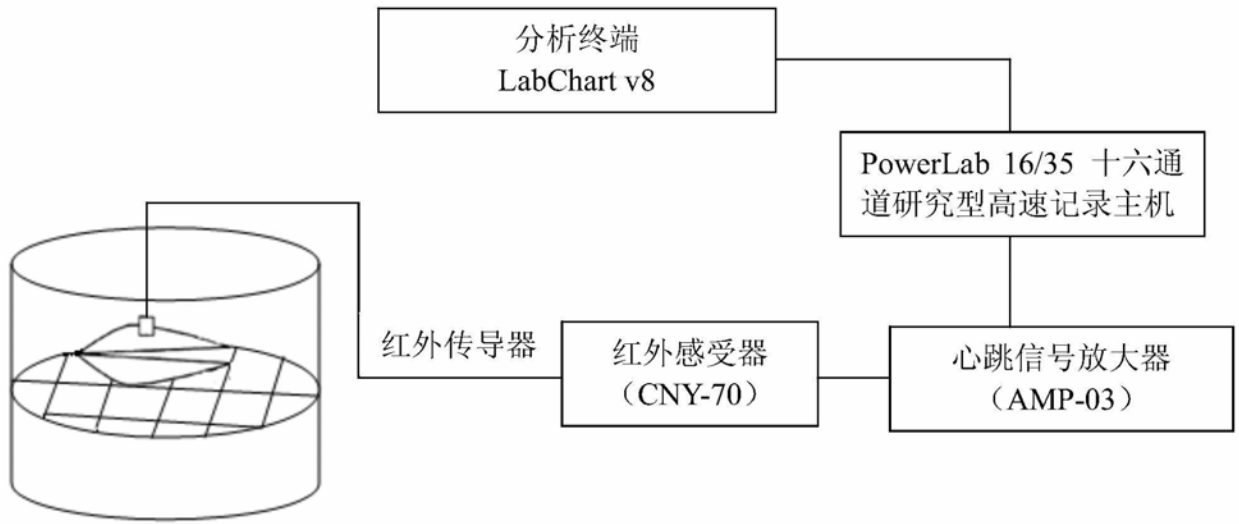


图1

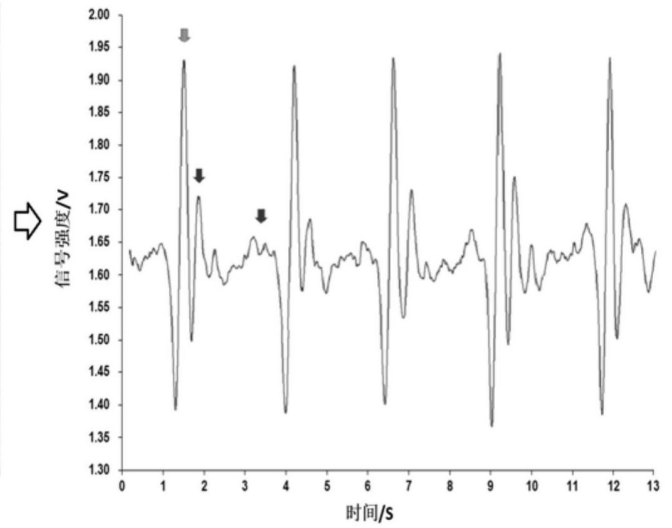


图2

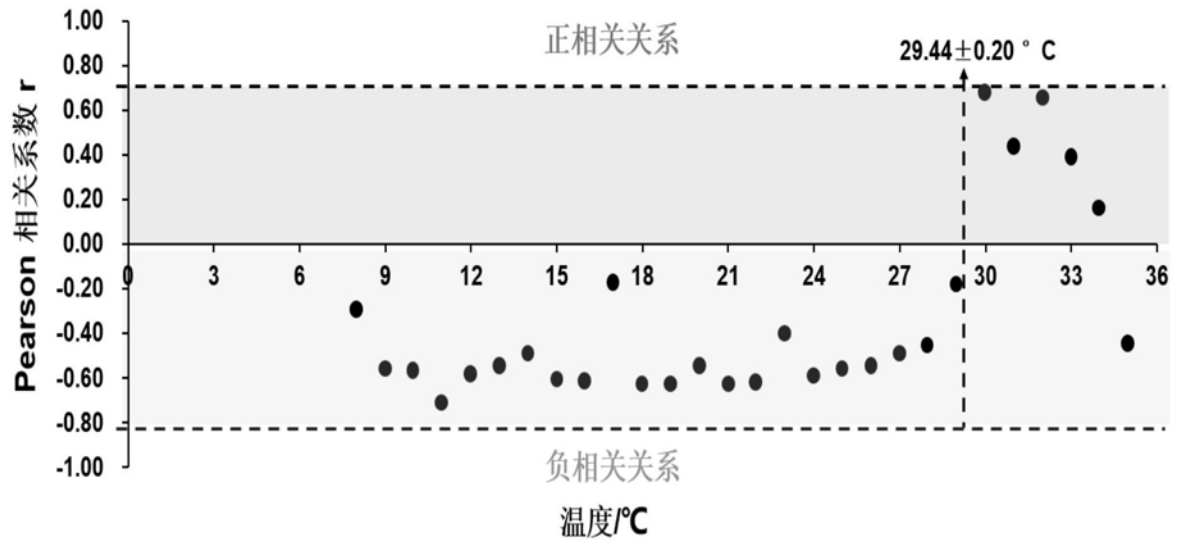


图3