

公開

密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：150201F103

# 行政院農業委員會漁業署九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：  
(英文名稱) **餌料生物生產供應鏈建立與應用 (第1年/全程1年)**  
**The establishment of supply chain management on live food production**

計畫編號：97農科-15.2.1-漁-F1(3)

全程計畫期間：97年7月1日至97年12月31日

本年計畫期間：97年7月1日至97年12月31日

計畫主持人：冉繁華  
執行機關：國立台灣海洋大學



# 目 錄

頁次：

目錄	i
中文摘要	ii
英文摘要	iii
前言	1
文獻整理	2
材料方法	10
結果	16
討論與檢討	18
參考文獻	20
附錄	23

## 摘要

本計劃針對餌料生物培育系統進行建立，室內外系統皆採用2噸FRP桶及打氣裝置進行輪蟲及豐年蝦的培育。結果顯示輪蟲條件為鹽度12-25ppt、溶氧2.0ppm以上、pH7.8~8.5；豐年蝦鹽度25-30ppt、溶氧2.5ppm以上、pH8.0~8.5；輪蟲及豐年蝦在營養鹽充足的情況下光照對此兩種餌料生物生長無影響。

將輪蟲以微藻及輪蟲培養液投餵以比較不同滋養物質之利用性，實驗結果平均增殖率以輪蟲培養液最佳。

利用浸泡蛋粉IgY的方式使輪蟲攜帶蛋粉。魚類若食用有攜帶蛋粉的輪蟲後，可因此增強對外界抗原的免疫力。透過 SDS-聚丙烯醯膠蛋白質電泳 (SDS-PAGE) 分析結果顯示出輪蟲經由浸泡蛋粉方式，可分析出含有蛋粉蛋白質。此外利用分子生物技術的方式偵測輪蟲是否會因感染神經壞死病毒而使魚類因攝食而遭受感染。首先針對神經壞死病毒的 DNA 序列設計專一性引子，以 PCR 方式偵測輪蟲的基因，實驗結果顯示輪蟲並未感染神經壞死病毒。

## Abstract

This project is in accordance with setting up building living organism culture system. room internal and external system adopt 2 ton FRP barrel and inflate device to foster rotifer and Artemia. Result show that the condition of rotifer is in salt degrees of 12-25ppt, dissolve oxygen 2.0ppm above, pH7.8- 8.5; the condition of Artemia is salt degrees of 25-30ppt, dissolve oxygen 2.5ppm above, pH8.0- 8.5. Rotifer and Artemia's illumination in a situation that the nutrition salt is sufficient in have not been influenced to grow.

Feed it with micro algae and rotifer solution to compare utilization of rotifer, it is the best that the average rate of increase of experimental result is rotifer solution.

Utilize the way to soak powdered egg IgY to make the rotifer carry the egg powdered. If the fish ate rotifer which carries the egg powdered will strengthen the immunity to external antigen. Through SDS-PAGE analysis result that demonstrates the rotifer can analyse and contain the egg powdered protein by soaking the egg powdered. And through technology of molecule biotechnology analyze to detect rotifer whether the rotifer can cause the fish infection nerve necrosis virus because of the take in rotifer suffers NNV. First, design a primer for DNA of NNV, detecting the gene of the rotifer by way of PCR, the experimental result shows the rotifer has not been infected with the NNV.

## 前言

我國的水產種苗培育技術，居世界的翹楚。然而從受精卵開始，經由孵化、餵養至成魚期間，溫度、鹽度、照度的監控及營養充足的餌料等皆為養成的重要因素，其中又以餌料生物的供給為最。經過數十年的試驗，由於方便性、花費有效性、簡單性及應用上的多樣性，微藻、輪蟲、橈足類及豐年蝦等動植物性浮游生物是一般水產動物種苗適用的餌料。雖然在早期魚苗用配合飼料上的開發有所進展，但至今仍無法完全取代餌料生物在魚苗時期的利用，尤其作為海水魚苗初期餌料用的海水輪蟲，自1960年被認為是必要的餌料生物後，至今仍未找到更好的替代性種類。因此餌料生物生產在種苗培育上也成為了不可缺少的一環。

早期動物性餌料生物之營養強化主要強調 n-3 多元不飽和脂肪酸含量的增加，在近年來擴大為維生素、抗氧化劑、免疫增強劑等，其主要目的除提高魚苗的成長及存活率外，更能增強魚苗免疫及抗病力，使我國魚苗在國際競爭力上更勝一籌。

餌料生物為魚蝦貝苗養成不可缺的天然餌料。由於供應時間及供應量必需配合之數量與成長階段，且其增殖量又會受到其生物性的限制，所以常有不能適時、適量供應的問題發生。在臺灣，餌料生物的生產模式目前多仍停留在戶外、大面積，以魚漿、飼料、雞糞作水的方法培養。因受氣候之影響，產量難以估計且近年來又受病害威脅而使餌料生物成為病菌之帶原者。然而室內高密度生產模式其產量雖可以預期，卻仍有技術層面的需求，以及為達可控制所必需投入之設備及成本上的考量，因此建立一套符合經濟成本考量且能同時適時、適量及穩定的提供優質且營養充足餌料生物的培育系統，以及添加免疫增強劑強化餌料生物營養並增強魚苗免疫及抗病力，成為未來發展的重點。

本計劃將針對餌料生物培育系統進行建立，分別針對室內外環境條件(溶氧、水質、鹽度及機械性干擾)找出最佳化條件，同時進行營養強化實驗，將餌料生物以不同滋養物質如藻類或IgY等進行營養強化及增加抵抗力，再比較餌料生物對於不同滋養物質之利用性，並透過分子生物技術針對所培養出來的浮游生物進行抗體、病毒比對，已確定是否達預期之評估。

## 文獻整理

### 皺摺臂尾輪蟲 (*Brachionus plicatilis*)

#### 1、系統分類

袋形動物門 Subclass Aschelminthes

輪蟲綱 Class Rataoria

真性輪毛蟲亞綱 Order Eurotatoria

壺形輪蟲目 Suborder Brachionoida

壺形輪蟲科 Family Brachionoidae

壺形輪蟲屬 Genus *Brachionus*

#### 2、生態

輪蟲 (rotifer) 是一種小型的動物性浮游生物 (130~320  $\mu\text{m}$ )，因為其頭部有一圈類似轉輪狀的纖毛冠 (ciliated corona) 固有此名。早期被認為是造成鰻魚池水華或泛池的主因，因為當輪蟲大量繁生時會快速消耗水中的溶氧，使魚池產生泛池造成水色轉清。自 1962 年人們發現輪蟲中少數幾種為香魚幼苗最適餌料後，輪蟲從此受到極大的重視。其後許多學者也經由實驗在鯛魚、草蝦、斑節蝦、蟳等水產生物發現到良好的繁殖成果，後來更發現輪蟲帶有酵素活性，使之成為各種海水魚類初期飼育不可缺少的餌料 (趙等， 2002)。

#### 3、輪蟲的養殖

輪蟲類的分布雖然廣闊，從淡水、半淡鹹水到海水均有族群的存在，但真正適合大量培養且可供應養殖使用的品種則只限於 *Branchionus* 屬的少屬幾種而已。影響輪蟲增殖的因子包含食物、溫

度、鹽度、光、養殖槽狀態、輪蟲本身生理狀況等，以下就分別描述：  
食物

輪蟲以濾食為主，大型輪蟲可濾食大小約5~25  $\mu\text{m}$ 之食物，極小型輪蟲可濾食2~20  $\mu\text{m}$ 的食物，因此只要是小於25  $\mu\text{m}$ 的微藻、酵母、細菌、蛋白質、微膠囊飼料、有機碎屑等都可被輪蟲濾食（趙等，2002），但整體而言，餵飼輪蟲的餌料大小以15  $\mu\text{m}$ 以下更為理想（張，1997）。如果使用體型較小的微藻來投餵輪蟲，則輪蟲每日可攝取的藻類細胞數目將會比較大型的微藻來的多，其攝食率也會較好。由於輪蟲的營養成分主要是來自被食入的微藻、酵母或細菌（Fulks and Main, 1991），故當缺乏食物時，其營養價值就會急速下降，因此餵飼輪蟲的頻率也是直接影響收獲輪蟲的品質。

微藻是最早用來當作輪蟲的餌料，例如淡水綠藻中的小球藻屬（*Chlorella*）、海洋擬球藻（*Nannochloropsis spp.*）、等鞭金藻（*Isochrysis galbana*）、四鞭扁藻（*Tetraselmis tetathele*）等。微藻種類使用的選擇上，主要考量輪蟲的養殖地點是否能夠提供穩定及足夠數量的藻種（Fulks and Main, 1991）。使用方面，可直接以藻水、濃縮藻、冷凍乾燥的微藻粉等模式添加。而當使用濃縮或冷凍乾燥的微藻粉來投餵時，輪蟲濃度甚至可達20000~35000  $\text{ml}^{-1}$ （Yoshimura *et al.*, 1995; 1997a; Fu *et al.*, 1997）。

酵母菌亦可用來餵飼輪蟲，如海水酵母（*Candida sp.*）、烘培酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、蛋糕酵母（*Rhodotorula sp.*）。酵母相較微藻在使用上更為方便，可節省人力、設備，且輪蟲的增殖率也不錯（蘇等，1998）。但是單單使用由酵母培養的輪蟲來投餵魚苗，會因為缺乏高度不飽和脂肪酸而有營養缺乏的情形，造成魚苗畸形或死亡率上升。此問題可利用滋養液或微藻進行二次培養作營養強化或與

微藻一起使用飼餵來改善 (Oie *et al.*, 1994; 蘇等, 1998)。

## 溫度

輪蟲生產於溫帶或熱帶，對於水溫的適應性很強。當水溫低於10°C以下時蟲體雖死亡，但會形成耐久卵以度過不良的環境。不同種類的輪蟲其增殖與適應溫度範圍並不一樣。極小型(SS)及小型輪蟲(S)在水溫15~37°C可增殖，最適溫為28~33°C，屬於高溫窄溫型。水溫34°C時可增殖250%。大型輪蟲在水溫5~35°C時會增殖，最適溫為25~28°C，屬低溫廣溫型，25°C時可增殖170%(趙等, 2002)。

## 鹽度

輪蟲雖有淡水、半淡鹹水及海水等三類，但還是以半淡鹹水種之*Brachionus plicatilis*最為重要。其對鹽度的耐受性最大，可適應於1~60 ppt的環境中，以10~20 ppt的增殖率為最佳。一般來說，配合輪蟲之游泳力、食物消化、轉換率及微藻之生長，則以15~25 ppt為最合適之培養鹽度(趙等, 2002)。

## 溶氧

溶氧對輪蟲增值之影響亦因其大小而異。大型種在2.3 ppm溶氧以上時，其增殖率與產子數皆不受影響，但若是降為0.9 ppm，則不增殖。小型輪蟲在溶氧為0.9~6.1 ppm間均不受影響，因此小型種之打氣適量即可。在使用打氣之時應注意以下因素：

- (1)打氣太大會使輪蟲所攜帶的卵掉落並使水中之懸浮顆粒揚起。
- (2)打氣過小將不利消化菌作用，使水中氨濃度快速累積，已致水質惡化。
- (3)採用微量的打氣方式可抑制橈足類的增殖，因為其需氧量較輪蟲高。綜合上列因素，該如何調整打氣(增氧)方式，應視整個情形來做判斷(趙等, 2002)。

## pH



輪蟲在pH小於5或大於10的環境之下是不能生存的。通常以pH 7.5~8.5間其增殖情形最佳(趙等，2002)。

## 氨

氨為有機物(殘餌糞便)分解所產生。過高含量的氨對輪蟲的存活率增殖均有不良的影響。不同體型的輪蟲其半致死濃度對分別為L: 17.0; S: 13.2; SS: 7.8 ppm(趙等，2002)。

## 牟氏角毛藻

牟氏角毛藻(*Chaetocero muelleri*)屬矽藻綱(Bacillariophyceae)、圓心目(Centrales)、角毛藻科(Goniotrichaceae)。直徑為6~9 μm，於光學顯微鏡下觀察有四根刺，所以又稱之為角刺藻。由細胞壁四端衍生出來的角毛細長且尖銳，末端無分叉現象，兩端角毛以細胞體為中心時，俯視觀看形狀略微“S”形。細胞型態為長方形或圓形，大多以單個細胞存在，於良好環境下但亦有數十個細胞連在一起形成群體現象發生。此種藻培養需要在強光高溫下，所以就台灣而言，中南部較為常見。北部培養則需要設置環境達到此藻所需的條件，否則無法一年四季大量培養。培養角刺藻最適鹽度為13~18 ppt；光照10000~15000 Lux；溫度25~30℃；pH 8.0~8.9。於此環境下培養且供給適當的打氣，一星期內藻色即呈現金黃色(趙等，2002)。

角刺藻在一般環境下採二分裂之無性生殖繁殖，唯有環境不良時才會產生休眠孢子。休眠孢子是由母細胞形成，此狀態細胞之內含物質集中至藻體中央，而後分泌厚壁形成。細胞無殼環，只有細胞與細胞之間相套合且帶有角刺，等待環境良好時再行二分裂繁殖。另一生殖方式為有性生殖，即為形成增大孢子(Auxospore)。恢復最初細胞大小後再行無性生殖(趙等，2002)。養殖方面常見投餵對蝦及牡蠣(Su et al., 1997)。

## 海洋擬球藻

海洋擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 屬金藻門 (Chrysophycophyta)、真眼點藻綱 (Eustigmatophyceae)、真眼點藻目 (Eustigmatales)、單珠藻科 (Monodopsidaceae)。直徑為 2~5  $\mu\text{m}$ 。擬球藻的分類位階在早期被列為綠藻門、綠藻綱、四胞藻目、膠球藻科的擬球藻屬，在日本稱之為海水綠球藻 (marine *Chlorella*)。美國 Droop (1969) 及加拿大 Antia (1975) 等人將此藻與所投餵的海水綠球藻經由色素、細胞構造及分裂數值的比對後，發現此藻的特徵與海水綠球藻並無任何親源關係，反而與金藻門、真眼點藻綱具有相同的色素成分 (葉綠素 a、 $\beta$  胡蘿蔔素及葉黃素)，且光合作用下的產物均為金藻昆布糖及岩藻留醇；在細胞特徵方面則無細胞壁、葉綠餅 (girdle lamella) 構造；無性生殖以二分裂形成兩個子細胞。經由以上證據顯示，因此將此藻歸納在金藻門的單珠藻科。型態上無鞭毛、眼點，因與綠球藻外觀極為相似，故亦稱之為擬綠球藻，簡稱擬球藻。亦有人稱為海產綠球藻、海水單胞藻、微綠球藻。

擬球藻主要棲息地帶為溫帶水域。鹽度適應範圍極廣，5~77 ppt 皆能增值，而以 20~35 ppt 為最適鹽度範圍。通常養殖池中皆以純海水培養；光度為 1,000~12,000 Lux 之間，Hirata (1980) 指出光照對此藻類的培養很重要，所以養殖水深以 50~60 cm 為適，照光時間以 12~14 小時為佳；pH 值範圍為 7.5~8.8 偏鹼性之水域內；溫度 10~35  $^{\circ}\text{C}$ ，而以 25~31  $^{\circ}\text{C}$  為最佳。

擬球藻細胞採二分裂方式增殖，無動孢子現象。細胞分裂後，子細胞由母細胞膜裂開處脫離，形成許多大小不等細胞。養殖方面多應用於壺形輪蟲滋養及海水魚苗之投餵；亦可直接投餵當作文蛤、牡蠣、淺蜆及真參幼生之餌料 (蘇，1999；趙等，2002)。

## 周氏扁藻

周氏扁藻(*Tetraselmis chui*)屬綠藻門(Chlorophycophyta)、綠色鞭毛藻綱(Prasinophyceae)、綠色鞭毛藻目(Prasinocladales)、綠色鞭毛藻科(Prasinocladaceae)，直徑為 8~16  $\mu\text{m}$ 。相關中文名為四鞭毛藻、綠色鞭毛藻。藻體型態為橢圓或卵圓形，細胞內有一杯狀並呈現綠色之色素體，其為葉綠體，而細胞後端有一蛋白核。在杯狀缺口處伸出四根等長鞭毛。此屬藻類於淡、海水環境下皆可採集到，而海水種常發現於海灣及潮池中並造成水華；亦有與海中生物產生共生現象(趙等，2002)。扁藻大多具有眼點，通常為橙紅色，沒有特定位置，有些種類無眼點。藻體游動快速，呈長軸轉動，無法明確看出四根鞭毛所在。

周氏扁藻培養溫度適應範圍為 15~30  $^{\circ}\text{C}$ ，以 25  $^{\circ}\text{C}$  生長狀況為佳，15  $^{\circ}\text{C}$  為劣；鹽度在 10~40 ppt 均能增值，20~40 ppt 無顯著差異，但在 30 ppt 的環境下增值效果最佳。在冬天寒冷氣候中，其增值率隨著鹽度的上升而提高；光度之耐受性較其他海水微藻廣泛，可在低光照環境下分裂生長，光照強度為 500~10,000 Lux，隨著照度的提升，其增值率亦直線上升(蘇，1999；趙等，2002)。

周氏扁藻行二分裂無性生殖，顯微鏡下觀察型態上的改變分為三個時期，即為鞭毛期、不動無性增值期以及帶有厚殼之不動囊胞期。在更換培養液後 1 至 2 天內，由於游動細胞的強烈趨光特性，使得光週期期間輕微搖晃瓶口，便可發現錐形瓶上方有明顯易見之綠色絲狀影像，顯微鏡觀察下即可看出此期為鞭毛期；一個禮拜後，由於營養鹽的缺乏使得鞭毛掉落，進而轉為不動無性增值期；隨著種類的不同，囊胞期的時間也不盡相同。有些種類在形成新的細胞壁時會促使

舊壁的脫落；有些種類之細胞壁會一層層的將細胞包圍住；有些種類則在細胞之一端增厚形成一柄狀物(蘇，1999；趙等，2002)。養殖應用方面常見於投餵輪蟲及海水魚苗；亦有投餵於貝介類之軟體動物及種苗培育(蘇，1999；趙等，2002)。

#### 4.IgY

IgY是由具有免疫性的母雞所生產的蛋黃中取得，由於IgY的結構與人體抗體IgG類似 (Polson et al., 1980)，與抗原結合的本質上也相似，因此理論上認為，抗體IgY可與體內的病菌抗原相結合，進而抑制病菌和腸壁細胞接觸的機會，提供身體的被動性免疫能力，來對抗抗原對身體的危害，使用特定的免疫球蛋白可以製造特殊之抗原鍵結來中和抗原對身體的作用。

#### 5.病毒性神經壞死症 (Viral nervous necrosis disease, VNN disease)

為近年來臺灣石斑魚養殖上極為嚴重疾病，其致病原為神經壞死病毒 (Nervous Necrosis Virus, NNV)。NNV 屬於野田病毒科 (Nodaviridae)  $\beta$  型諾達病毒屬 (betanodavirus)，是一種讓魚苗與幼魚引起病毒性神經壞死 (Viral nervous necrosis) 的病原，其立體結構為二十面體球狀結構，此病毒包含兩條不含 poly-A tail 的單股 RNA，分別為 RNA1 與 RNA2，RNA1 所產生的蛋白質為 RNA 聚合酶，RNA2 主要是外鞘蛋白 (Lu et al., 2003)。其最明顯病徵為體色變深、喪失平衡能力、迴旋於水面為病魚明顯病徵，最終沉入水底死

亡，此病毒感染易造成石斑魚苗及幼魚大量死亡，體長超過 4 mm 的幼魚不受此病影響。從組織病理可見魚苗在神經組織有全面性壞死現象，組織還會有腦脊髓炎（encephalomyelitis）和空泡性腦-視網膜病變（vacuolating encephalopathy and retinopathy，VER），而其他器官無異狀（Yoshikoshi and Inoue, 1990）。截至目前為止，至少會感染五個目的十六個科中之三十多種海水魚（林，2006）。

## 材料方法

### 一、餌料生物培育系統之建立

利用玻璃纖維桶 (FRP) 進行輪蟲蓄養測試。

### 二、餵食不同微藻及輪蟲液對純蟲增殖率之影響

#### 1. 實驗設計：

在 2 公升的三角錐瓶中添加 1 公升的天然海水，水中輪蟲和微細藻的密度分別為 20 隻/ml 和  $2.5 \times 10^5$  cell/ml，溫度為 26~28°C，鹽度維持在 35ppt，實驗在微光的環境下進行。

實驗分為四組，每組三重複。四組分別是以 *Nannochloropsis oculata*，*Chaetoceros muelleri*，*Tetraselmis chui* 及市售輪蟲培養液來培養輪蟲。實驗為其 3 天，3 天後採樣計算輪蟲增殖率。

#### 2. 輪蟲

##### 蓄養：

實驗用輪蟲來自台南養殖戶，以空運寄送，飼養一噸水體的 FRP 桶中。輪蟲下桶前先以不同網目之浮游生物網 (100、150、200、300 網目) 進行篩選以除去橈腳類、豐年蝦等大型浮游生物。

##### 計算輪蟲方法：

實驗初始輪蟲密度 20 隻<sup>-1</sup>投餵前自實驗組中隨機採水 5ml，添加 1ml formaline 後靜置 5 分鐘，抽取底部沉澱輪蟲並以顯微鏡及計數器觀察計數以推算缸中輪蟲數。

輪蟲族群成長率的計算方法：

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

$t_1$  = 起始日

$t_2$  = 結束日

$X_1$  = 初始輪蟲量

$X_2$  = 在  $t$  天培養之後的輪蟲量

(蘇等, 1990)

### 3. 微藻

藻種來源由東港水試所餌料生物室提供，於本實驗室純化繼代之擬球藻(*Nannochloropsis oculata*)、牟氏角毛藻(*Chaetocero muelleri*)、周氏扁藻(*Tetraselmis chui*)，以培養基 (f/2 配方) (Guillard, 1975) 培養。

#### 培養方法：

在 250 毫升錐形瓶中添加 f/2 培養液及過濾海水 100 毫升後進行高溫高壓滅菌 121 °C 20 分鐘。待冷卻後則立即接種 100 毫升藻水入 250 毫升錐形瓶，藻液維持在 200 毫升。待至培養 2~3 天後 (依藻種而定)，將藻液接種於 500 毫升已滅菌 f/2 培養液之錐形瓶中培養。而後再以上述方式將 500 毫升培養 2~3 天後接種於 20 公升可滅菌塑膠桶 (PVC 桶)，添加已高溫高壓滅菌過的 f/2 培養液及過濾海水 12~14 公升後培養約 2~3 天。

#### 4. 輪蟲培養液：

使用方法遵照說明每公升添加 0.01 ml，以高溫高壓滅菌 121 °C 20 分鐘，待冷卻後則立即接種輪蟲。

### 三、微藻及輪蟲液之菌落生長實驗

#### 1. 實驗設計：

將上實驗培養輪蟲之微藻及輪蟲培養液直接以三區劃線法方式均勻塗抹於固體培養基上，放置於 28°C 下培養 3 天，以相機拍照後比較其菌落數。

#### 2. 培養基：

TSB (tryptic soy broth, Difco ; 含 3% NaCl)。

### 四、IgY 抗體製備與評估：

#### 1. 蛋粉滋養輪蟲之全蛋白質萃取

取約 0.1 克滋養過蛋粉的輪蟲加入 200  $\mu$ l 的 1 X PBS buffer，用已滅菌過的研磨棒磨碎組織，再利用超音波振破儀 (550 Sonic Dismembrator) 於冰浴中振破細胞後，以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液至新的微量離心管儲存於 -20 °C 以備用。

#### 2. SDS-聚丙稀醯膠蛋白質電泳 (SDS-PAGE)

利用 Mini-PROTEAN® II 125BR (BIO-RAD) 蛋白質電泳系統，將預先用 70 % 酒精擦拭過的玻璃片組裝好，製備下層 12 % resolving gel (0.10 M Acrylamide / Bis-Acrylamide 40 % solution、0.375 M Tris-HCl, pH 8.8、0.1% SDS、0.005 % APS (ammonium persulfate)、0.033 M TEMED (tetramethylethylenediamine)，將膠體溶液注入鑄膠槽中約八分滿，並以約 1 ml 1-Butanol 壓平膠體，靜置約 30 分鐘以進行凝膠作用，待膠體凝固後小心倒出 1-Butanol，並使用裁剪成長條



狀的吸水性圖畫紙將剩餘的 1-Butanol 吸乾。同時配製上層 5 % stacking gel (0.05 M Acrylamide / Bis-Acrylamide、0.125 M Tris-HCl, pH 6.8、0.1% SDS、0.005 % APS、0.05 M TEMED)，將膠體溶液注入鑄膠槽中，並快速插入樣品梳以防止膠體凝固，靜置膠體約 30 分鐘，待凝固拔除樣品梳，即置備完成膠體。

將製備完成的膠體組裝至電泳槽中，並倒入 1X SDS running buffer，配製 10X SDS running buffer 劑量包含有 0.025 M Tris-HCl, pH 8.3、0.192 M Glycin、0.1 % SDS，將 10X SDS running buffer 稀釋成 1X SDS running buffer 後倒入電泳槽中，即可進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳。

取蛋白質樣品與 2X SDS sample buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8、4 % SDS、20 % glycerol、0.02 % Bromophenol blue、10 %  $\beta$ -mercaptoethanol) 以 1 : 1 的體積並加入適量 Dithiothreitol (DTT) 均勻混合，至沸水中煮沸 20 分鐘後，馬上置於冰上，即可注入樣品槽中，並注入 Mid-range Prestained Protein Marker 作為對照，先以 50 伏特電壓進行電泳 30 分鐘，待完成焦集作用以及 2X SDS sample buffer 泳動至兩層膠體的分隔線後，改以 100 伏特電壓進行約 1.5 小時，直到 sample buffer 泳動至膠體底部時終止電泳，即可將膠體至裝置上取出。將膠體置於 Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 染液 (2 g of Coomassie Brilliant Blue R-250、120 ml of methanol、40 ml of acetic acid、240 ml of ddH<sub>2</sub>O) 中直至蓋過膠體，並以搖晃狀態染色約 2 小時，倒掉染液，最後以 CBR 褪染液 (200 ml of methanol、100 ml of acetic acid、700 ml of ddH<sub>2</sub>O) 以呈現蛋白質色帶，約 20 分鐘更換一次 CBR 褪染液直到膠體呈現透明為止，即可擷取影像。

## 五、PCR 偵測輪蟲神經壞死病毒

### 1. 輪蟲之 RNA 萃取

秤取約 0.1 克的輪蟲加入已裝有 500  $\mu$ l REZol 後，取已滅菌過的均質棒浸泡於 DEPC 水，使用此均質棒將泡於 REZol 的組織均質後，再加入 500  $\mu$ l REZol 以及 200  $\mu$ l chloroform/isoamyl alcohol (24:1) 混合均勻，置於冰上 10~30 分鐘。在 4  $^{\circ}$ C 12,000 rpm 離心 20 分鐘，RNA 會溶於上清液水層中，將上清液吸取至新的微量離心管中，並加入與上清液等量的異丙醇 (isopropanol) 均勻混合，置於 -20  $^{\circ}$ C 下冰 1 小時，在 4  $^{\circ}$ C 12,000 rpm 離心 20 分鐘，小心移除上清液，將沉澱物小心以 70% 酒精清洗，快速離心移除酒精，待酒精完全揮發後，乾燥沉澱物 RNA，並加入 20  $\mu$ l DEPC 水以溶解 RNA，儲存於 -80  $^{\circ}$ C 中以備用。

### 2. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription - PCR, RT-PCR)

取輪蟲約 5  $\mu$ g 的 total RNA，及 1  $\mu$ l GSP(RT) primer 加至 eppendorf 中，均勻混合後煮 10 min，迅速放置於冰上，於冰上分別加入 2  $\mu$ l 5 mM dNTP、1  $\mu$ l MMLV (Moloney murine leukemia virus) 反轉錄酶 Reverse Transcriptase (10 units /  $\mu$ l, EPICENTRE)、2  $\mu$ l 10X MMLV buffer、2  $\mu$ l DTT 最後加入 DEPC 水至反應總體積為 20  $\mu$ l，於 40  $^{\circ}$ C 下反應 1 小時以合成 cDNA，再以 70  $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘終止反應。

### 3. 利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 偵測輪蟲之神經壞死病毒

利用輪蟲之 cDNA 當模板，以聚合酶連鎖反應大量擴增基因序列。1  $\mu$ l cDNA 加入 0.5  $\mu$ l *Taq* polymerase (2 Unit / 1  $\mu$ l; Protech

Technology)、2  $\mu$ l 2.5 mM dNTP、2.5  $\mu$ l 10X PCR buffer、專一性引子各 1  $\mu$ l 以及補滅菌水至總體積為 20  $\mu$ l。放入 PCR 反應器 (DNA Thermal cycler) 進行聚合酶連鎖反應。之後將 PCR 產物進行 2% 洋菜膠體電泳 (Agarose Gel Electrophoresis, 簡稱 AGE) 分析, 經溴化乙錠 (Ethidium bromide, EtBr; 0.5  $\mu$ g/ml) 染色約 5 分鐘後, 即可擷取影像。先使用 NNV-GSP-F 和 NNV-GSP-R 此對引子進行聚合酶連鎖反應, 擴增約 1 kb 的神經壞死病毒 DNA 序列, 再使用 GNNVT2F 和 GNNVT2R 此對引子擴增約 700 bp 的 DNA 序列, 以進行巢式 PCR。

引子名稱	引子序列
NNV-GSP-F	5'-ATGGTACGCAAAGGTGAGAAGAAAT-3'
NNV-GSP-R	5'-TTCCATATGTTAGTTTTCCGAGTCA-3'
GNNVT2F	5'-AGAATCTCCCAGGCCGTCCT-3'
GNNVT2R	5'-GAAACCAGCCTGCAGGTGTG-3'

## 結果

### 1. 餌料生物培育系統之建立：

室內外系統皆採用2噸FRP桶及打氣裝置進行輪蟲及豐年蝦的培育(Fig 1)。溶氧、水質、鹽度、光照最佳化條件試驗：完成輪蟲及豐年蝦環境因子最佳化條件之測試。結果顯示輪蟲在鹽度12-25ppt、溶氧2.0ppm以上、pH7.8~8.5；豐年蝦鹽度25-30ppt、溶氧2.5ppm以上、pH8.0~8.5；輪蟲及豐年蝦在營養鹽充足的情況下光照對此兩種餌料生物生長無影響。

### 2. 投餵不同餌料對輪蟲增殖率之影響：

增殖率已輪蟲培養液之效果較優於其他微藻實驗組為0.536；而微藻的增殖率優劣依序為Nanno、Tetra、Chaeto，分別為0.291、0.157、0.10 (Table. 1)。

### 3. 比較微藻及輪蟲培養液之帶菌評估

輪蟲液之菌落數為0，而微藻因無法滅菌以致有明顯菌落生長 (Fig 2)。

### 4. IgY抗體製備與評估：

結果顯示實驗組餌料生物已攜帶所添加的IgY抗體(總分子量約為180kDa，重鏈分子量為66kDa，輕鏈為22kDa) (Fig3)。故以IgY蛋粉餵食輪蟲確實可攜帶IgY入魚體內。經由SDS-PAGE分析結果得知，經過蛋粉滋養過的輪蟲其全蛋白質，可分析出含有微量的蛋粉蛋白質。

### 5. 利用PCR偵測輪蟲神經壞死病毒

利用NNV-GSP引子進行聚合酶連鎖反應擴增輪蟲中的神經壞死

病毒，輪蟲中並未偵測出神經壞死病毒，以1 %洋菜膠體電泳分析 (Fig 4)。利用NNV-GSP引子擴增後的PCR產物，再以GNNVT2引子再次進行聚合酶連鎖反應，輪蟲中並未偵測出神經壞死病毒，以2 %洋菜膠體電泳分析(Fig 5)。

## 檢討與討論

實驗中的輪蟲族群的成長效果不如預期，推測可能是因為實驗設計的培養環境並不是輪蟲增殖的最適合環境。另外也有研究報告指出在輪蟲少藻類多的培養環境下進行半連續性培養會造成有機物的累積使水質惡化(James and Abu Rezeq, 1989; Treece and Davis, 2000; Lubzens et al., 2001)造成輪蟲活力降低，進一步影響了輪蟲族群的成長。

報告指出輪蟲的繁殖速率和食物有很大關聯(Edmondson, 1965; Snell et al., 1983; Hotos, 2002)，微細藻的大小、形狀、營養組成和可消化率會影響輪蟲的攝食。實驗中發現最小的微細藻類Nanno有最好培養效果，且在藻體細胞的構造上，Nanno的型態比較簡單。Chaeto的藻體細胞雖然也小，但是其外型因為有從細胞壁四端衍生出來的角毛，其細長且尖銳，造成了輪蟲濾食的不便。而Tetra的外型雖然不如Chaeto那樣會造成輪蟲濾食的困難但是其體型大且活動力強進而影響了輪蟲的攝食率。

有多份報告指出輪蟲的消化速率會隨微細藻的密度的增加而增加，然後在一個特定的點為最高峰，之後維持不變或減少(Pourriot, 1977; Starkweather, 1980; Snell et al., 1983; Korstad et al., 1989b; Hotos, 2002)。本實驗中所設定之微藻濃度或許並未達到一極限值，造成輪蟲生長曲線未達顛峰值，未來針對此現象應有更多的探討，

此外本實驗利用餵食輪蟲蛋粉 IgY 的方式，使浮游生物輪蟲可攜

帶蛋粉，魚類若食用有攜帶蛋粉的輪蟲後，可因此增強對外界抗原的免疫力。經由 SDS-聚丙烯醯膠蛋白質電泳 (SDS-PAGE) 分析結果顯示出輪蟲經由浸泡蛋粉方式，可分析出含有蛋粉蛋白質。利用分子生物技術的方式偵測輪蟲是否因感染神經壞死病毒，進而使魚類因此而遭受感染。實驗結果顯示輪蟲並未感染神經壞死病毒。未來也可利用連續 PCR 來檢測其他病毒，例如石斑魚虹彩病毒等。

## 參考文獻

- 蘇惠美、雷淇祥、廖一久，1990。溫度、光照度及鹽度對骨藻生長速率之影響。臺灣水產學會刊, 17 (3): 2213-222。
- 蘇惠美，王淑欣，蘇茂森，1998。海水輪蟲培養用餌料之評估。上海水產大學學報(第三屆世界華人魚蝦營養研討會論文集)7，355-359
- 蘇惠美，1999。餌料生物之培養與利用。台灣省水產試驗所東港分所出版。39-64。趙文榮，曾金成，陶申秋，2002。餌料生物學
- 張道南，1997。褶皺臂尾輪蟲的培養。出自“生物餌料培養”，陳明耀主編。初版，43-164。基隆：水產出版。
- Antia, N.J., Bisalputra, T., Cheng, J.Y., Kalley, J.P., 1975. Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloropsis oculata* and *Monallantus salina* in the Eustigmatophyceae. J. Phycol. 11, 339-343.
- Edmondson, W.T., 1965. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. Ecol. Monogr. 35, 61-111.
- Edmondson, W.T., 1965. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. Ecol. Monogr. 35, 61-111.
- Fu, Y., Hada, H., Yamashita, T., Yoshida, Y., Hino, A., 1997. Development of continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. Hydrobiologia 358, 145-151.
- Fulk, W., Main, K., 1991. The design and operation of commercial scale live feeds production systems. In “Rotifer and Microalgae Culture System”, eds. W.Fulks and K.Main, 3-52. Hawaii: The Ocean



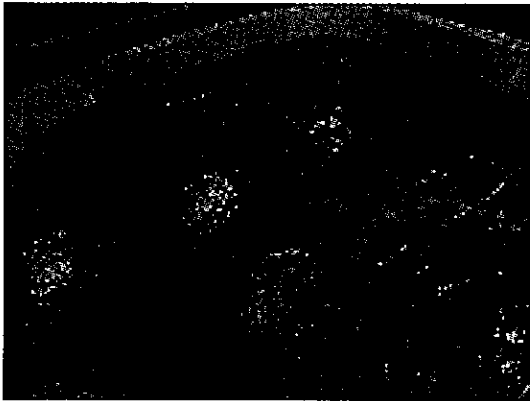
Institute.

- Hirata, H., 1974. An attempt to apply an experimental microcosm for the mass culture of marine culture, *Brachionus plicatilis* Muller. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ., 23, 167-172.
- Hirata, H., 1980. Culture method of Marine *Chlorella*. Yoshoku, 17, 79-82.
- Hotos, G.N., 2002. Selectivity of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed mixtures of algal species with various cell volumes and cell densities. Aquac. Res. 33., 949-957.
- James, C.M., Abu Rezeq, T., 1989b. Intensive rotifer cultures using chemostat. Hydrobiologia 186/187, 423-430.
- Korstad, J., Vadstein, O., Olsen, Y., 1989b. Feeding Kinetics of *Brachionus plicatilis* fed *Isochrysis galbana*. Hydrobiologia 186/187, 51-57.
- Lu, M.W., Liu, W., Lin, C.S., 2003. Infection competition against grouper nervous necrosis virus by virus-like particles produced in *Escherichia coli*. J Gen Virol 84, 1577-1582.
- Lubzens, E., Zmora, O., Barr, Y., 2001. Biotechnology and aquaculture of rotifer. Hydrobiologia 446/447, 337-353.
- Oie, G., Olsen, Y., 1994. Comparison of rotifer culture quality with yeast plus oil and algal based cultivation diet. Aquaculture Int., 2, 225-238.
- Pourriot, R., 1977. Food and feeding habits of Rotifera. Arch. Hydrobiol., Beih. 8, 243-260.
- Polson, A., M. B. von Wechmar, et al. (1980). "Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens." Immunol Commun 9(5): 475-93.
- Pourriot, R., 1977. Food and feeding habits of Rotifera. Arch. Hydrobiol., Beih. 8, 243-260.
- Rouse, D.B., Webest, C.D., Radwin, I.A., 1992. Enhancement of the fatty acid composition of nematode *Panagrellus*

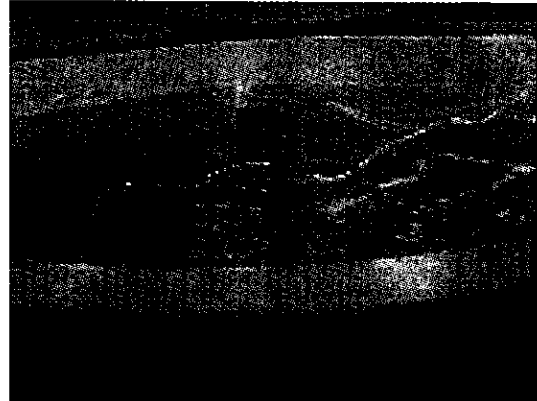
- redivivus* using three different media. J. World Aquacult. Soc. 23(1), 89-95.
- Snell, T.W., Bieberich, C.J., Fuerst, R., 1983. The effects of green and blue-green diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture 31, 21-30.
- Starkweather, P.L., 1980. Aspects of the feeding behavior and trophic ecology of suspension-feeding rotifer. Hydrobiologia 73, 63-72.
- Su, H. M., Su, M. S., Liao, I. C., 1997. Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan. Hydrobiology 358, 37-40.
- Treece, G.D., Davis, D.A., 2000. Culture of small Zooplankters for the Feeding of Larval Fish. Southern Regional Aquaculture Centre (SRAC) Publication, vol.701.
- Yoshimura, K., Iwata, T., Tanaka, K., Kitajima, C., Isizaki, F., 1995. A high density cultivation of rotifer in an acidified medium for reducing undissociated ammonia. Nippon Suisan Gakkaishi 61, 602-607.
- Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., Hagiwara, A., 1997a. Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* tschugunoff. Hydrobiologia 358, 139-144.

## 附錄

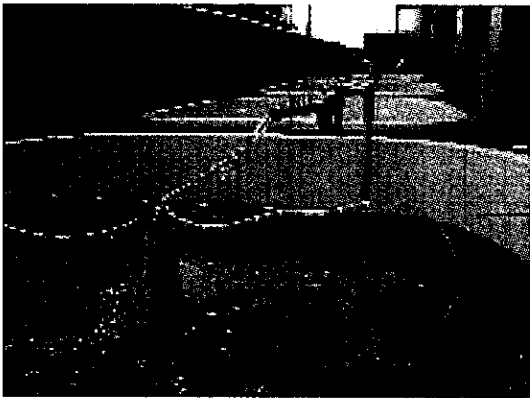
Fig 1. 餌料生物培育系統



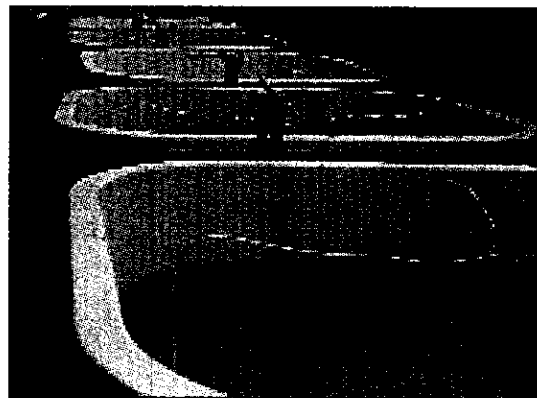
a.



b.



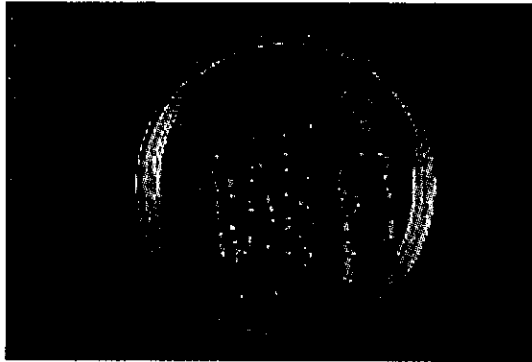
c.



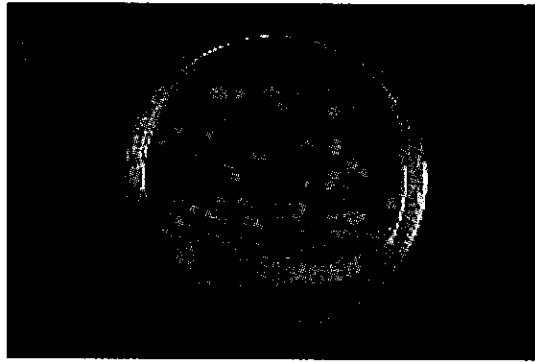
d.

a. 室內培育系統 1；b. 室內培育系統 2；c. 室外培育系統 1；d. 室外培育系統 2

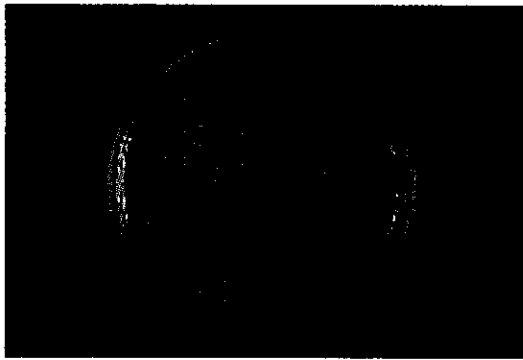
**Fig 2** 不同微藻及輪蟲培養液之劃菌情形



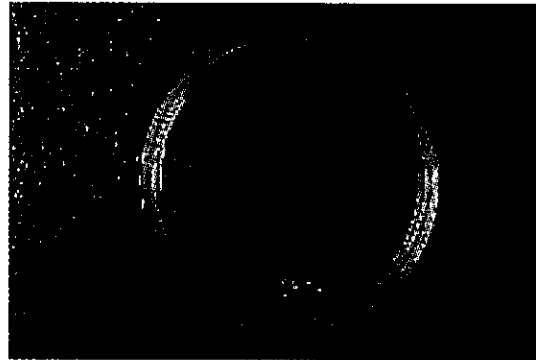
**a**



**b**



**c**



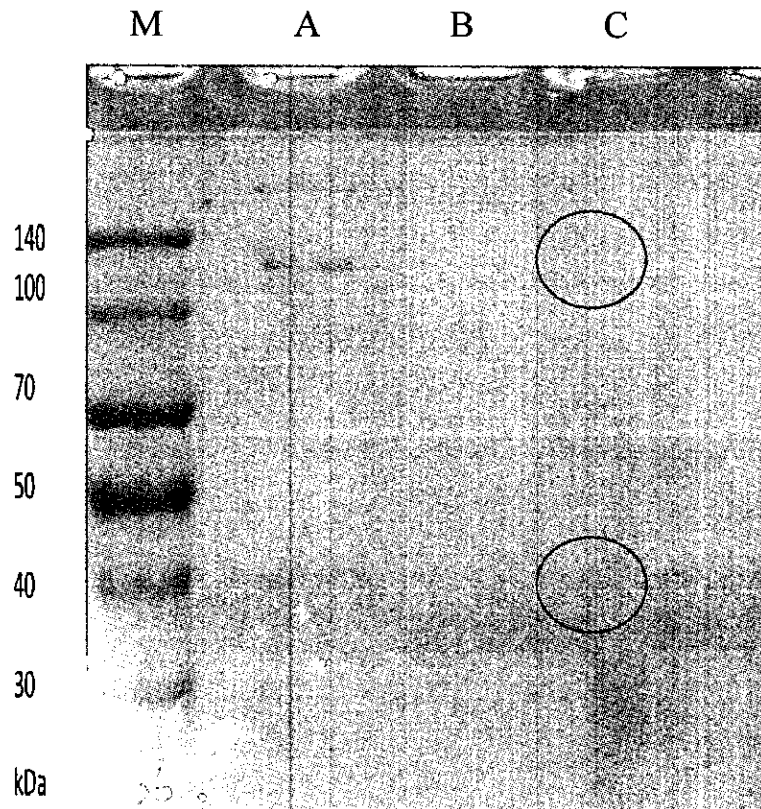
**d**

**a:** *Nannochloropsis oculata*

**b:** *Tetraselmis chui*

**c:** *Chaetocero muelleri*

**d:** 輪蟲培養液



**Fig 3**

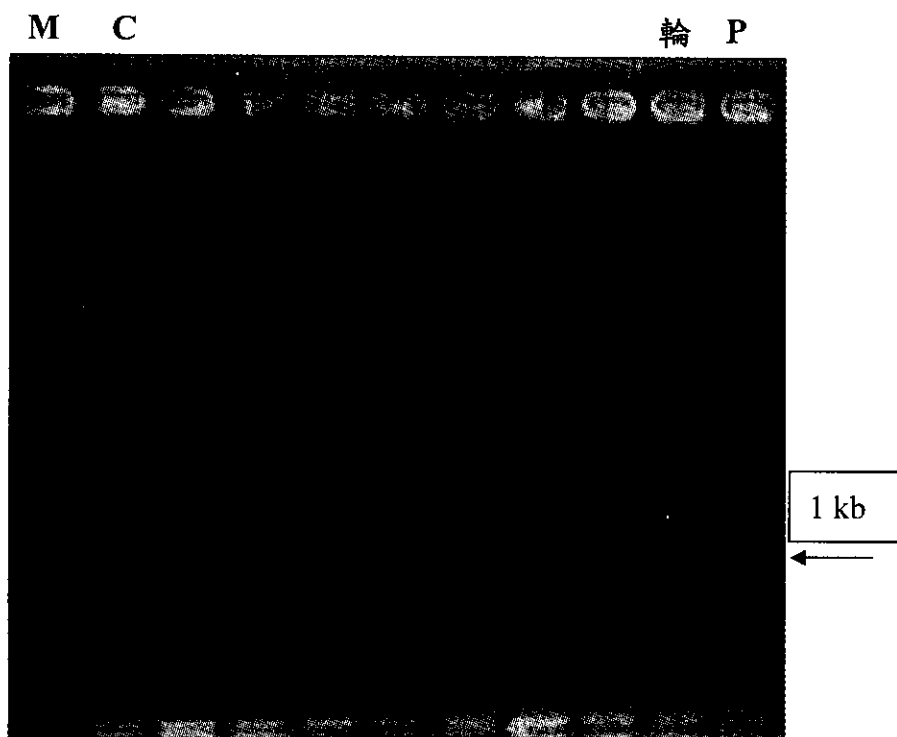
經由 SDS-PAGE 分析結果得知，經過蛋粉滋養過的輪蟲其全蛋白質，可分析出含有微量的蛋粉蛋白質，紅色圓圈所指為蛋粉蛋白質。

**A:**蛋粉蛋白質

**B:**輪蟲之全蛋白

**C:**滋養蛋粉後之輪蟲全蛋白

**M:**Prestained Protein Marker



**Fig 4.**

利用 NNV-GSP 引子進行聚合酶連鎖反應擴增輪蟲中的神經壞死病毒，輪蟲中並未偵測出神經壞死病毒，以 1 % 洋菜膠體電泳分析。箭頭所指處為神經壞死病毒的 DNA 擴增出約 1 kb 的 DNA 片段。

**M:**100 bp DNA marker

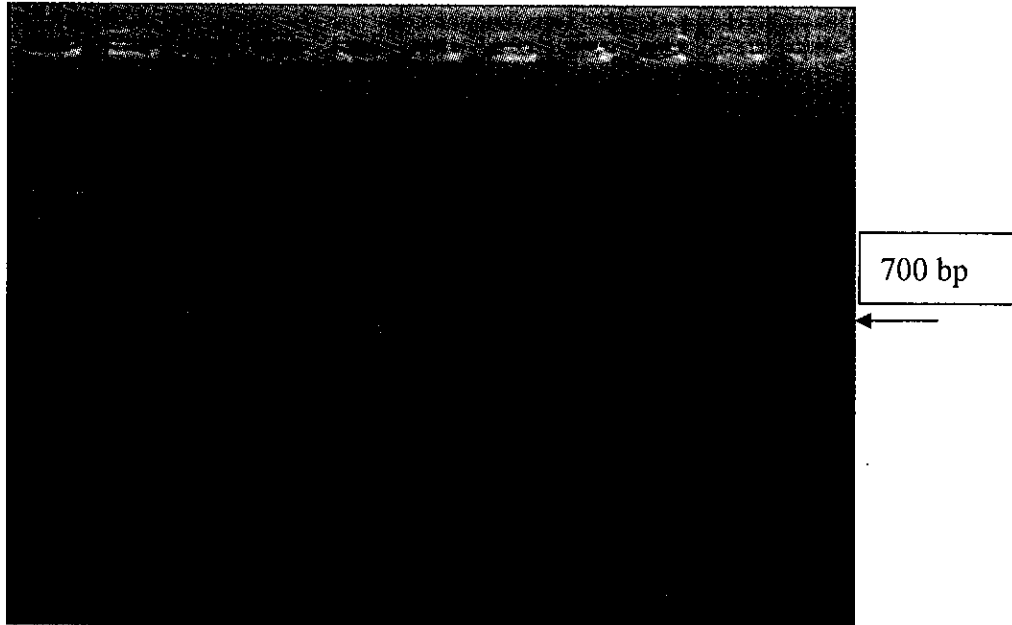
**C:**negative control

**輪:**輪蟲 cDNA

**P:**positive control

M C

輪 P



**Fig 5**

利用 NNV-GSP 引子擴增後的 PCR 產物，再以 GNNVT2 引子再次進行聚合酶連鎖反應，輪蟲中並未偵測出神經壞死病毒，以 2 % 洋菜膠體電泳分析。箭頭所指處為神經壞死病毒的 DNA 擴增出約 700 bp 的 DNA 片段。

**M:100 bp DNA marker**

**C:negative control**

**輪:輪蟲 cDNA**

**P:positive control**

Table 1. 輪蟲投餵佈同微藻及輪蟲培養液之平均增殖率

投餵種類	平均增殖率
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0.536
<i>Tetraselmis chui</i>	0.291
<i>Chaetoceros muelleri</i>	0.157
輪蟲培養液	0.10