

猪源多杀性巴氏杆菌 PCR 鉴定方法的建立

黄海燕¹, 王 印^{1,2*}, 彭 娟^{1,3}, 宋 勇¹, 蒋 梅¹, 钟 霏¹, 李丽瑞¹

(1. 四川农业大学动物医学院, 雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014;
3. 内江市动物疫病预防控制中心, 内江 641000)

摘 要: 为建立一种灵敏、特异的猪源多杀性巴氏杆菌 PCR 检测方法, 根据 GenBank 已公布的多杀性巴氏杆菌 *plpE* 基因序列的保守片段设计合成引物, 经 *plpE* 基因阳性质粒构建、反应条件的优化、特异性试验和敏感性试验, 对猪源多杀性巴氏杆菌特异性 PCR 检测方法进行了研究; 并将该 PCR 方法用于检测来自四川省 6 个规模化猪场的 64 份疑似多杀性巴氏杆菌肺部组织样品。结果显示, 建立的 PCR 方法具有良好的特异性和敏感性, 检测的敏感性为 5×10^1 拷贝的目的基因; 多杀性巴氏杆菌 (A、B、D 血清型) PCR 均为阳性、APP 和 HPS 等病原均为阴性; 64 份临床疑似样品中检出 36 份样品阳性, 阳性检出率为 56.2%。以 *plpE* 基因初步建立的多杀性巴氏杆菌 PCR 检测方法具有较好的特异性、重复性、敏感性和可靠性, 可用于多杀性巴氏杆菌的检测鉴定。

关键词: 多杀性巴氏杆菌; *plpE*; 16SrRNA; PCR; 检测

中图分类号: S852.612

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)07-1111-06

Development of PCR Identification Method for *Pasteurella multocida* from Porcine

HUANG Hai-yan¹, WANG Yin^{1,2*}, PENG Juan^{1,3}, SONG Yong¹,
JANG Mei¹, ZHONG Fei¹, LI Li-rui¹

(1. College of Animal Medical, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China; 2. The Key Laboratory of Animal Disease and the Human Health of Sichuan, Yaan 625014, China;
3. Neijiang Animal Disease Prevention and Control Center, Neijiang 641000, China)

Abstract: The objective of this study was to develop a sensitive and specific PCR method for the detection of *Pasteurella multocida* from porcine. A pair of primers were designed according to the *plpE* genes of *Pasteurella multocida* published in GenBank. Then the specific PCR method on the basis of the *plpE* gene was developed and optimized for rapid detection of *Pasteurella multocida*. The sensitivity of the method were evaluated with the constructed recombinant plasmid of *Pasteurella multocida* and other strains. Finally the PCR method established was employed on the detection of 64 suspected samples collected from Sichuan province. Results showed the method based on the *plpE* gene can amplify the genome of *Pasteurella multocida* only, not for others and the detection limitation reached 5×10^1 copies. Thirty-six samples were infected with *Pasteurella multocida* and the positive rate reached 56.2%. These results indicate that the PCR method on the basis of the *plpE* gene is specific, repeatable and sensitive and can be used for the detection of *Pasteurella multocida*.

Key words: *Pasteurella multocida*; *plpE*; 16S rRNA; PCR; detection

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm) 是一种两端钝圆, 中央微突的短杆菌或球杆菌, 革兰

氏染色阴性的需氧兼性厌氧菌,大多为单个存在,有时成双排列,瑞氏染色或美蓝染色时,可见典型两极着色^[1]。按产毒素与否,可将 Pm 分为非产毒素 Pm (Non-Toxingenic *Pasteurella multocida*, T-Pm)和产毒素 Pm (Toxingenic *Pasteurella multocida*, T + Pm)^[2]。按荚膜抗原可分为 A、B、D、E 和 F 5 个血清群(型);按菌体抗原可分为 16 个血清型^[3]。该菌是多种动物的重要病原菌,也是人的条件致病菌,可以导致禽霍乱、猪传染性萎缩性鼻炎 (Atrophic rhinitis, AR)、猪肺疫和猪呼吸道疾病综合征 (Porcine respiratory disease complex, PRDC)、牛羊兔出血性败血症等传染病。Pm 无宿主特异性,可通过相互接触经呼吸道进行水平和垂直传播^[4], 2004 年 Davies 等报道该菌甚至可以在不同的宿主间发生种间传播,汤细彪等研究表明各种血清型的 Pm 均还有多种不同的耐药基因^[5], Pm 的这些特点导致其广泛流行于全世界。该菌常与多种病原菌协同感染,尤其是与副猪嗜血杆菌 (HPS)、猪胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 和猪肺炎霉形体 (MH), 不仅增加猪群呼吸道疾病的发病率和死亡率,造成巨大的经济损失,也给临床诊断带来困难^[6-7]。目前 Pm 的检测技术主要是分离鉴定、PCR、ELISA、限制性酶切分析和 DNA 杂交等,其中应用较普遍、灵敏快速的是 PCR,而 PCR 检测扩增用引物大多根据 Pm 的 16S rRNA 和 *kmt* 基因设计^[8-9],经 Pm 16SrRNA 和 *plpE* 基因的序列分析得知 Pm 16SrRNA 与 APP、HPS 16S rRNA 序列相似性均达 93% 以上;所以根据 Pm 16S rRNA 建立的 PCR 存在不足之处。APP、HPS 不含有 *plpE* 基因且不同血清型 Pm *plpE* 基因序列相似性在 92% 以上;研究表明 *plpE* 基因存在于所有血清型的多杀性巴氏杆菌且是该菌的特异保守基因^[10-11]。由此本研究拟以 *plpE* 基因为基础建立多杀性巴氏杆菌特异性 PCR 方法,并用该方法对临床组织样品进行检测。

1 材料与方法

1.1 菌种和试剂

APP(1 型)、HPS(4 型)、鸭疫里氏杆菌 (RA)、溶血性曼氏杆菌 (MH)、沙门氏菌 (O6、O7)、大肠杆菌 (O101、O139、O141 和 O157)、猪肺炎霉形体 (Mhp)、金黄色葡萄球菌、链球菌和 Pm(A、B、D 型)标准株由四川农业大学动物检疫研究室保存。2 × Taq PCR Master Mix 购于 Biomed; *E. coli* DH5α

感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; DNA Maker DL2000 和 PmD 19-T Simple Vector 均购于大连宝生物有限公司; Tryptone、Yeast extract 购自 Oxiod 公司; E. Z. N. A TM Gel Extraction Kit(D2501-01)和 E. Z. N. A TM Plasmid Mini Kit(D6942-01)购自 Omega。64 份疑似 Pm 感染肺部组织样品均来自四川省各地 6 个规模化猪场。

1.2 引物

根据 GenBank 收录的不同血清型 Pm *plpE* 基因全序列,利用 DNASTar 和 Primer Premier 5.0 软件分析设计出 1 对引物,引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成,按合成说明书将其稀释至 10 μmol · L⁻¹, -20 °C 冻存备用。

表 1 Pm *plpE* 基因扩增用引物

Table 1 Primers used for the amplification of *plpE* genes of *P. multocida*

引物名称	引物序列	产物长度/bp
Primer name	Primer sequence	Product length
Pm <i>plpE</i>	F: 5'-ATGAAACAAATCGTTTTTAAA -3' R: 5'-TAATGTGTCTTGGTGACTT-3'	1 011

1.3 Pm、HPS 和 APP 标准株的复苏、增殖及其基因组 DNA 的提取

将保存的 APP(1 型)、HPS(4 型)、鸭疫里氏杆菌 (RA)、溶血性曼氏杆菌 (MH)、沙门氏菌 (O6、O7)、大肠杆菌 (O101、O139、O141 和 O157)、金黄色葡萄球菌、链球菌、Pm(A、B、D 型)菌液分别划线于 TSA 培养基,置 37 °C 恒温培养箱培养过夜;猪肺炎霉形体标准株接种于 A26 培养基,37 °C 200 r · min⁻¹ 恒温水浴摇床培养 2~6 d;根据文献^[12] 提取以上菌株的总 DNA。

1.4 Pm 标准株的 PCR

以提取的 Pm 标准株 (A、B、D 血清型) 基因组 DNA 为模板,用设计的引物 Pm *plpE* 进行 Pm 的 PCR。反应体系: 2 × Taq PCR Master mix 10.0 μL, 上、下游引物 (10 μmol · μL⁻¹) 各 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 加去离子水补足 25.0 μL。反应程序: 94 °C 4 min; 94 °C 40 s, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

反应结束后取 5 μL PCR 扩增产物进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,并于凝胶成像系统下观察结果。

1.5 Pm 标准株 *plpE* 基因 PCR 产物的克隆与鉴定

参照 E. Z. N. A TM Gel Extraction Kit(50)(D2501-01)使用说明纯化回收预期的 Pm *plpE* 基因 PCR 产物;根据 PmD 19-T Simple Vector 说明书将回收产物与 T 载体连接后转化 DH5 α 感受态细胞(TSS 一步法制备);涂布于 X-gal/IPTG/Amp LB 琼脂培养基进行蓝白斑筛选挑菌和扩大培养,按照 E. Z. N. A TM Plasmid Mini Kit(D6942-01)步骤提取重组质粒,进行 PCR 和电泳鉴定,将 PCR 鉴定阳性重组菌送往上海英潍捷基贸易有限公司进行序列测定。

1.6 PCR 扩增条件的优化

以 Pm *plpE*-PmD19T 重组质粒为模板,分别进行 Pm *plpE* 基因的 PCR 的退火温度和反应时间等条件的优化试验。

1.7 特异性试验

以“1.3”中提取的 APP(1 型)、HPS(4 型)、鸭疫里氏杆菌(RA)、溶血性曼氏杆菌(MH)、沙门氏菌(O6、O7)、大肠杆菌(O101、O139、O141 和 O157)、猪肺炎霉形体(Mhp)、金黄色葡萄球菌、链球菌和 Pm(A、B、D 型)基因组 DNA 为模板,用 Pm *plpE* 引物按照“1.6”优化后的反应程序进行 PCR 扩增,反应结束后取 5 μ L PCR 产物进行凝胶电泳分析。

1.8 敏感性试验

抽提 Pm *plpE*-PmD19T 阳性重组质粒,用 ND-1000 紫外分光光度计定量后进行 10 倍梯度稀释,分别按照“1.6”确定的反应条件进行 PCR 检测方法灵敏度试验。

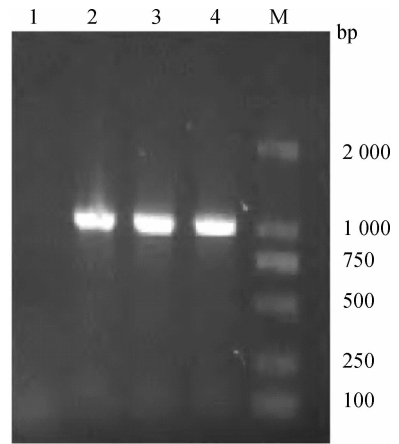
1.9 临床样品的检测应用

应用建立的 PCR 方法对采自四川省 6 个规模化猪场的 64 份疑似 Pm 感染的样品进行检测,同时按照文献[13]进行巴氏杆菌细菌的分离鉴定。

2 结果

2.1 Pm 标准株的 PCR 结果

按照“1.3”操作,以 Pm *plpE* 为引物,提取的 Pm(A、B、D 3 种血清型)标准株基因组 DNA 为模板进行 PCR,以 ddH₂O 做阴性对照。结果如图 1 所示:3 种血清型的 Pm 均能扩增出预期大小 1 011 bp 的目的条带,对照组为阴性。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~4. 双蒸水、A 血清型 Pm、B 血清型 Pm、D 血清型 Pm

M. DNA marker II;1-4. ddH₂O, Pm serotype A, Pm serotype B, Pm serotype D

图 1 A、B、D 血清型 Pm 的 PCR 结果

Fig. 1 The PCR results of Pm serotypes A, B and D

2.2 Pm 标准株 *plpE* 基因 PCR 产物的克隆与鉴定

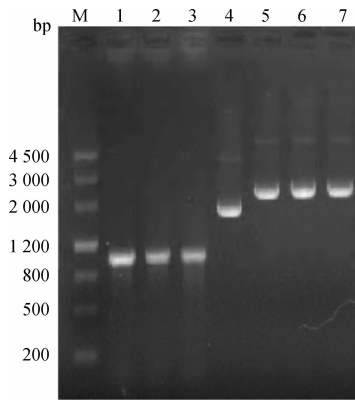
将“1.5”操作纯化回收 3 种血清型 Pm 的 *plpE* 基因产物、进行连接转化筛选阳性重组质粒,进行电泳鉴定和 PCR 鉴定。结果如图 2 所示:所有重组质粒(泳道 5~7)迁移速度较空载体(泳道 4)慢,重组质粒的普通 PCR 鉴定均扩增出预期大小的特异性条带。并将阳性重组质粒测序结果经 DNA Star 分析序列相似性,发现其与所有已登录 *plpE* 基因(登录号 EF219452.1;EF219453.1;EF219454.1 等)序列相似性高达 95%~99%,这表明 Pm *plpE* 引物 PCR 扩增出预期的特异性条带。

2.3 Pm *plpE* 引物 PCR 条件优化结果

按照“1.6”操作对 Pm *plpE* 引物的 PCR 反应时间和退火温度进行优化。Pm *plpE* 引物 PCR 退火温度优化结果如图 3:泳道 1、2、3 PCR 产物相对较少,泳道 4、5、6 效果理想且差异不大,为节省时间,Pm *plpE* 引物 PCR 最佳反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 40 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

2.4 特异性试验结果

按照“1.7”以 Pm *plpE* 为扩增引物进行特异性试验,结果如图 4 所示:除 Pm 基因扩增阳性外,其他菌株均无特异性扩增,表明以 *plpE* 基因检测建立的 PCR 方法具有良好的特异性。

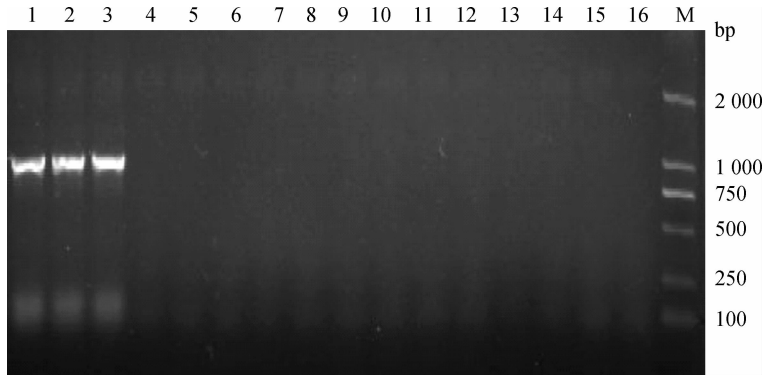


M. DL4500 DNA 相对分子质量标准;1~3. A-PMD-T PCR 产物、B-PMD-T PCR 产物、D-PMD-T PCR 产物; 4. PMD19-T 载体;5~7. A-PMD-T 质粒、B-PMD-T 质粒、D-PMD-T 质粒。A-PMD-T 代表 A 血清型多杀性巴氏杆菌 *plpE* 基因的阳性克隆质粒, B-PMD-T 和 D-PMD-T 同理

M. DNA marker III; 1-3. A-PMD-T PCR product, B-PMD-T PCR product, D-PMD-T PCR product; 4. PMD19-T simple vector; 5-7. A-PMD-T plasmid, B-PMD-T plasmid, D-PMD-T plasmid. A-PMD-T stands for the constructed recombinant plasmid of *plpE* gene of *Pasteurella multocida* serotype A, the same as B-PMD-T and D-PMD-T

图 2 Pm PCR 扩增产物鉴定结果

Fig. 2 The identification results of PCR for Pm serotypes A, B and D



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~3. Pm(A,B,D 型); 4~16. 大肠杆菌(O101、O139、O141、O157)、金黄色葡萄球菌、链球菌、沙门氏菌(O6、O7)、APP(1 型)、HPS(4 型)、鸭疫里氏杆菌(RA)、溶血性曼氏杆菌(MH)、猪肺炎霉形体(Mhp)

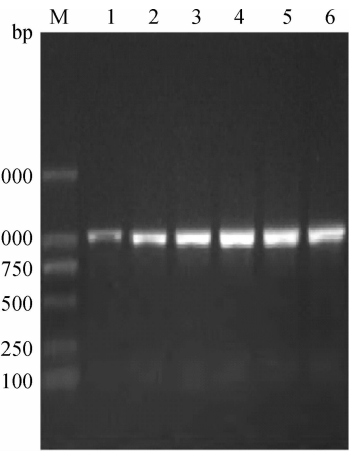
M. DNA marker II; 1-3. Pm (serotype A, B, D); 4-16. *E. coli*(O101, O139, O141, O157), SA, *S. suis*, SE (O6, O7), APP (serotype 1), HPS (serotype 4), RA, MH, Mhp

图 4 Pm plpE 引物 PCR 特异性

Fig. 4 The specificity of PCR by Pm plpE primers

2.6 PCR 的临床应用检测结果

按照“1.9”中操作对采自四川省 6 个规模化猪场的 64 份疑似 Pm 感染的样品分别进行 PCR 检测和细菌分离鉴定,详细结果如表 2。



退火温度:1. 56.0 °C;2. 55.4 °C;3. 54.4 °C;4. 52.8 °C;5. 50.9 °C;6. 49.5 °C

PCR products amplified with various annealing temperature; 1. 56.0 °C; 2. 55.4 °C; 3. 54.4 °C; 4. 52.8 °C; 5. 50.9 °C; 6. 49.5 °C

图 3 Pm PCR 退火温度的优化

Fig. 3 The annealing temperature optimization results of Pm PCR

2.5 Pm plpE 引物 PCR 敏感性试验结果

按照“1.8”的操作将重组质粒定量稀释后作为模板进行敏感性检测,结果如图 5 所示,其敏感性可达 5×10^1 个拷贝的目的基因。

3 讨论

由于多杀性巴氏杆菌血清型众多,且相互之间没有或者有很弱的交叉免疫原性;自身带有多种不

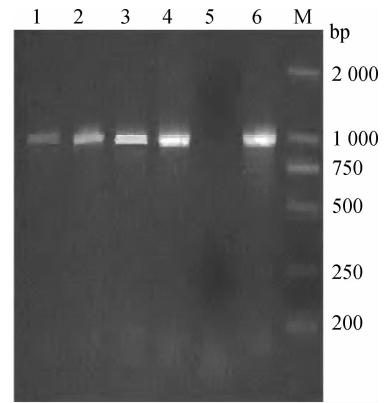
同的耐药基因;传播速度快,无宿主特异性;常与其它呼吸道病原菌共同感染等原因导致该病得不到有效控制,通常采用严格检测检疫、淘汰、强化管理等办法来减少该病造成的经济损失。目前检测多杀性巴氏杆菌的技术主要有细菌分离等传统的方法和分子生物学方法,后者包括种特异性 PCR、荚膜分型 PCR^[3,14]、产毒素多杀性巴氏杆菌的 PCR 鉴定^[15]、16SrRNA 基因测序法、DNA 杂交、大分子图谱、限制性酶切分析和核糖体分型、随机扩增 DNA 片段多态性、脉冲场凝胶电泳,ELISA^[16]等,由于多杀性巴氏杆菌是条件较苛刻的细菌,表性特征易受培养环境的影响,因此传统的检测方法结果不稳定,可靠性较差。而采用测序,杂交大分子图谱,酶切分析等技术成本较高,耗费大量时间和精力。因此应用最普遍,最简捷方便的是多杀性巴氏杆菌的 PCR 检测技术。

表 2 疑似样品 PCR 和细菌分离鉴定结果

Table 2 The detection results of suspected samples by PCR and isolation identification

检测方法	样品总数	阳性样品数	阳性率/%	阴性样品数	阴性率/%
Detection method	Total sample	Positive sample	Positive rate	Negative sample	Negative rate
PCR	64	36	56.20	28	43.80
细菌分离鉴定	64	30	46.87	34	53.13

2001 年 Townsend 等利用基因消减的方法对多杀性巴氏杆菌进行研究发现了多杀性巴氏杆菌基因组上 1 个特有区域,针对该多杀性巴氏杆菌特异性 DNA 序列设计引物,所有的多杀性巴氏杆菌都可以扩增出 1 个 460 bp 的片段,即 Pm-PCR^[3]。Hricinova 等建立了 Pm、HPS 和 APP 的多重 PCR,检测结果与细菌分离鉴定结果相符合^[7]。2004 年 Kamp 等经 GenBank 在线序列比对发现多杀性巴氏杆菌的翻译调节基因(Pm0762、Pm1231)不存在于其他任何细菌,由此建立的多杀性巴氏杆菌 PCR 检测方法具有种属特异性^[15]。Kamp 等根据 T⁺Pm 的毒素基因建立检测 T⁺Pm 的 PCR,并证明其与 ELISA 结果相同^[18]。本研究经已有研究成果查证和序列分析,根据存在于所有血清型的多杀性巴氏杆菌、相似性高(92%~99%)且特异的基因 *plpE* 建立了多杀性巴氏杆菌的特异性 PCR,产物大小为 1 011 bp,经条件优化具有良好的特异性和敏感性,为临床多杀性巴氏杆菌的检测、流行病学调查及其



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~4. 5×10^1 个拷贝、 5×10^2 个拷贝、 5×10^3 个拷贝、 5×10^4 个拷贝;5. 阴性对照;6. 阳性对照

M. DNA marker II; 1-4. 5×10^1 copies, 5×10^2 copies, 5×10^3 copies, 5×10^4 copies; 5. Negative control; 6. Positive control

图 5 Pm 特异性 PCR 敏感性试验

Fig. 5 Sensitivity test of the Pm specific PCR

更深层次的研究奠定了基础。

此外利用建立的多杀性巴氏杆菌 PCR 方法对来自四川省 6 个规模化猪场的 64 份疑似多杀性巴氏杆菌感染肺部组织样品进行初步检测,结果显示,64 份疑似多杀性巴氏杆菌感染检样中 36 份为多杀性巴氏杆菌阳性,检出率高达 56.2%。检测结果与经传统细菌分离鉴定结果基本相符,进一步说明以多杀性巴氏杆菌的 *plpE* 基因建立的 PCR 方法的可靠性和实用性,同时检测结果表明四川地区猪群多杀性巴氏杆菌感染和流行还需要引起人们的重视和预防。

4 结论

根据 *plpE* 全基因的保守序列设计引物,经反应条件优化、特异性和敏感性试验建立了多杀性巴氏杆菌特异性 PCR 方法,并用该方法对四川省 6 个规模化猪场疑似 Pm 感染的肺部组织样品分进行了检测,64 份疑似多杀性巴氏杆菌感染检样中 36 份

为多杀性巴氏杆菌阳性,检出率高达 56.2%。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 李伟杰, 赵 耘, 杜昕波, 等. 产毒素多杀性巴氏杆菌菌落双重 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(4): 298-300.
- [3] TOWNSEND K M, BOYCE J D, CHUNG J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 924-929.
- [4] 刘东胜. 多杀性巴氏杆菌细菌幽灵的研究 [D]. 江西: 南昌大学, 2008.
- [5] 汤细彪. 猪源多杀性巴氏杆菌的分子流行病学与致病性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [6] 肖国生, 曹三杰, 黄小波, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌、肺炎支原体和多杀性巴氏杆菌联合检测芯片的研制及应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(1): 77-85.
- [7] HRICINOVA M, HOLODA E, MUDRONOVA D, et al. Multiplex PCR assay for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus parasuis* in lungs of pigs from a slaughterhouse [J]. *Folia Microbiol*, 2010, 55: 635-640.
- [8] 亓英芳, 刘家森, 张在平, 等. 巴氏杆菌 PCR 诊断方法的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 7: 68-69.
- [9] 施少华, 程龙飞, 傅光华, 等. 检测禽多杀性巴氏杆菌 PCR 方法的建立 [J]. 福建农业学报, 2009, 24(3): 201-204.
- [10] SINGH A P, SINGH S, RANJAN S R, et al. Molecular heterogeneity of plpE gene in Indian isolates of *Pasteurella multocida* and expression of recombinant PlpE in vaccine strain of *P. multocida* serotype B:2 [J]. *J Vet Sci*, 2010, 11: 227-233.
- [11] WU J R, SHIEN J H, SHIEN H K, et al. Protective immunity conferred by recombinant *Pasteurella multocida* lipoprotein E (PlpE) [J]. *Vaccine*, 2007, 25: 4140-4148.
- [12] 郑维权, 春善朴, 永 哲, 等. 一种快速提取细菌总 DNA 的方法研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(4): 75-80.
- [13] 康立超, 黄 新, 何延华, 等. 禽多杀性巴氏杆菌分离鉴定及药物敏感试验 [J]. 畜牧兽医, 2009, 6: 24-25.
- [14] KIRSTY M, TOWNSEND H, FROST A J, et al. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 1096-1100.
- [15] KAMP E M, BOKKEN G C, VERMEULEN T M, et al. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1996, 8: 304-309.
- [16] TAKADA A, UTO T, MUKAI T, et al. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant toxin for detection of antibodies against *Pasteurella multocida* toxin [J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69: 581-586.
- [17] LIU D, LAWRENCE M L, AUSTIN F W. Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes [J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 58: 263-267.
- [18] KAMP E M, BOKKEN G C, VERMEULEN T M, et al. A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1996, 8: 304-309.

(编辑 白永平)