

建立 PC-PCR法快速、半定量检测养殖环境和 水产动物中的致病性副溶血弧菌

马妍^{1,2}, 李健², 王群², 何玉英², 王斌¹

(1. 大连水产学院生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023;

2 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:以 *tl* 为靶基因, 将菌落 PCR 技术和平板菌落计数法相结合, 建立致病性副溶血弧菌快速、半定量检测方法。PCR 扩增的目的片段为 673 bp, 人工污染样品检测最低限固体样品为 3.1×10^2 cfu/g, 液体样品为 1.3×10^2 cfu/mL, 菌落 PCR 每反应体系的检测低限为 90 cfu。对人工污染样品的检测结果显示, PC-PCR 方法检测结果与常规检测结果一致, 可用于养殖环境及水产品中细菌的动态监测。

关键词:副溶血弧菌; 快速检测; 半定量; 菌落 PCR; *tl* 基因

中图分类号: R378.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0864(2008)S1-0067-06

Rapid and Semi-quantitative Detection of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from Environment and Aquatic Animals by PC-PCR

MA Yan^{1,2}, LI Jian², WANG Qun², HE Yu-ying², WANG Bin¹

(1. College of Life Sciences and Biotechnology, Dalian Fisheries University, Liaoning Dalian 116023;

2. Key Opening Laboratory of Agricultural Ministry for Marine Fishery Resources Sustainable Utilization, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shandong Qingdao 266071, China)

Abstract: A rapid and semi-quantitative method was developed for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, using *tl* gene as a targeted gene, combined the method of plate count for bacterial colonies and colony PCR. The expected PCR product was 673 bp. Detection limit for artificial contaminants was 3.1×10^2 cfu/g of solid sample and 1.3×10^2 cfu/mL of liquid sample; Detection limit of colony PCR reaction system was 90 cfu. The contaminated samples were detected by both PC-PCR and routine methods with a completely coincident result. This integrated analytical PC-PCR method should be further applied for dynamic detection in aquaculture.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; rapid detection; semi-quantitative; colony PCR; *tl* gene

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 为革兰氏阴性多形态杆菌或稍弯曲弧菌, 广泛存在于养殖水域、底泥和沉积物中^[1], 能引起牡蛎肠炎^[2], 对虾红腿病^[3], 蟹大规模死亡^[4], 大黄鱼疾病^[5]等, 是海水养殖中主要的病原菌之一。由副溶血弧菌引起的疾病, 因发病率高、流行范围广、危害严重, 每年都给养殖业者造成了极大的经济损失。此外, 副溶血弧菌也广泛存在于海洋食品中, 可引起人类腹泻等肠道疾病及食物中毒^[6], 是国家规

定的水产品必检项目。

传统的副溶血弧菌生化鉴定方法操作繁杂、检验周期长, 需要 7d 以上才能获得结果^[7]。为提高检测效率和准确率, 近些年来出现了基于免疫学的 ELISA 方法^[8], 基于核酸杂交技术的斑点杂交、Southern 杂交和夹心杂交^[9-11]等方法, 基于 PCR 技术的常规 PCR、多重 PCR 和荧光定量 PCR^[12, 13]等众多快速检测方法。其中, 根据特异基因序列, 设计引物, 进行 PCR 检测, 是现阶段检

收稿日期: 2008-02-27; 修回日期: 2008-03-23

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A406), 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A13) 和公益性农业行业科研专项 (nyhyzx07-042) 资助。

作者简介: 马妍, 硕士研究生, 主要从事海洋致病微生物评估研究。E-mail: kkt518@tom.com。通讯作者: 李健, 研究员, 主要从事海水健康养殖和水产药理研究。Tel: 0532-85830183; E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

测致病性副溶血弧菌的最快速准确的方法,越来越被科研和商检等部门认可,成为流行的副溶血弧菌检测方法。但是 PCR 技术针对反应体系中的模板 DNA 进行扩增,无法鉴别死活菌体,不能满足监测活菌的需求。由于平板菌落计数法 (plate count for bacterial colonies, PC) 的最大优点是可获得活菌数量,本文根据 *stx* 基因设计引物,用菌落 PCR 法检测靶基因,结合平板菌落计数法,以期建立一种副溶血弧菌的半定量、快速检测方法,用于养殖环境及水产动物中可培养的致病性副溶血弧菌的监测。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验菌株的来源和菌株号如表 1。

1.2 工具酶与试剂

Taq DNA 聚合酶, dNTPs, DL2000 DNA ladder marker 购自 Solarbio 公司; GeneFinder 购自百维信生物有限公司; Tris base, SDS, EDTA 购自 Sigma 公司; 琼脂糖购自华美公司; TCB S 琼脂、TSB 培养基等购自青岛高科园生物技术有限公司。

1.3 细菌的培养

将实验菌株接种于 TSB 液体培养基中, 30 振荡培养过夜, 获得处于对数生长期的菌体。

1.4 血平板检测

将处于对数生长期的菌液用接种环点至兔血平板中, 共点四环, 平均分布于平板平面, 并在点种处做记号。置 30 培养箱培养 24~30 h, 点种处出现溶血圈者为阳性, 用“+”表示, 可初步判断该菌具溶血活性; 未出现溶血现象的则为阴性, 用“-”表示。

1.5 细菌染色体 DNA 的提取

参照 Miyamoto 等的快速盐抽提法^[14], 提取实验菌株的基因组 DNA。

1.6 PCR

根据 NCBI 上 *stx* 基因序列 (M36437), 用 Primer primer5.0 设计引物, 由上海生物技术有限公司合成。序列如下:

5'-TTGAATGTGCTTGGGTCA-3';

5'-CGTTAAAGATGTTGCCTGT-3';

PCR 采用 25 μ L 反应体系: 模板 DNA 1 μ L, 10 mmol/L 的 *stx* 上下游引物各 2 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, Taq 酶终浓度 1.25 U, 5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 加灭菌 dH₂O 补足至 25 μ L。PCR 程序参数: 94 变性 4 min; 94 1 min, 57 30 s, 72 3 min, 30 个循环; 72 延伸 10 min; 4 保存。

PCR 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行分离, 用紫外透射检测仪检测电泳结果。

表 1 菌株来源及编号

Table 1 The accession numbers and source of bacteria strains

实验菌株 Strains	菌株号 Accession number	来源 Sources
副溶血弧菌 Vibrio parahaemolyticus	CGMCC1.1614	中国科学院微生物研究所菌种保藏中心
	CGMCC1.1997	Strain Preservation Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
	CGMCC1.2164	Strain Preservation Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
溶藻弧菌 Vibrio alginolyticus	CGMCC1.1833	中国科学院微生物研究所菌种保藏中心
	PX 25	本实验室 Our laboratory
鳃弧菌 Vibrio anguillarum	W-1	中国科学院微生物研究所菌种保藏中心
	L-18	Strain Preservation Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences
	DL P 18	本实验室 Our laboratory
嗜水气单胞菌 Vibrio fluvialis	927	本实验室 Our laboratory
灿烂弧菌 Vibrio splendidus	HS-21	本实验室
	HS-19	Our laboratory

1.7 菌落 PCR退火温度和体系优化

将不添加模板的 PCR 体系预先分装到个 0.2 mL PCR 管中。用灭菌牙签挑取少许标准株的单菌落,在 0.2 mL PCR 管中轻轻搅动,使牙签上沾粘的菌体在反应体系中充分混匀。而后用三种不同的方法处理,先煮沸 10 min,冷却后进行 PCR 反应;先在 -80 冷藏 10 min,再进行 PCR 反应;不做任何处理,直接进行 PCR。在常规 PCR 基础上,将退火温度 (T_m) 在 47 ~ 57 间设置梯度,用 PCR 仪的梯度功能自动分成 12 个温度,找到最佳退火温度;改变常规 PCR 体系中 Taq 酶量,使菌落 PCR 达到最佳的扩增结果。设立以产生溶血现象的标准株 CGMCC1.1997 DNA 为模板的阳性对照,不加模板的为空白对照。

1.8 敏感性实验

1.8.1 菌落 PCR 的敏感性 用麦氏比浊法将分别挑取的 CGMCC1.1997、CGMCC1.1614、CGMCC1.2164 单菌落,配成 10^8 cfu/mL 稀释液,使每个 PCR 反应体系中菌液的终浓度分别为 10^8 cfu/mL、 10^7 cfu/mL、 10^6 cfu/mL、 10^5 cfu/mL、 10^4 cfu/mL、 10^3 cfu/mL、 10^2 cfu/mL、 10^1 cfu/mL (共 8 个梯度,每个梯度设 3 个平行管)。同时取相应的菌液 0.1 mL 涂布 TCBS 平板,每个稀释度设 3 个平行。

1.8.2 PC-PCR 法的敏感性 将处于对数生长期的菌液,用灭菌生理盐水洗菌数次,而后用麦氏比浊法配成 10^8 cfu/mL 细菌悬浊液。按上述方法倍比稀释,依次添加到对虾肌肉、对虾肝胰腺、对虾血液、海水、底泥中,固体样品每组称取 10 g 匀浆,液体样品每组量取 10 mL,分别加入 90 mL 灭菌生理盐水中,各取菌液 0.1 mL 涂布 TCBS 平板,每个稀释度设 3 个平行。取未添加菌株的同批样品,按上述方法涂布 TSBS 平板,设为空白对照。

1.9 特异性实验

用建立的 PC-PCR 方法检测培养的副溶血弧菌及其他菌株。

1.10 人工感染养殖体系,检测副溶血弧菌的数量及分布状态

在实验室内模拟养殖环境,将致病性副溶血弧菌标准株投放到养殖水体中,感染 12 h 虾体出现红腿症状后,取对虾肌肉、对虾肝胰腺、对虾血液、海水、底泥,用 TCBS 培养基测定弧菌总数;挑

取用于计数的两个稀释度平板上的每个单菌落,进行菌落 PCR,显阳性的菌落即为一个致病性副溶血弧菌菌体,对照其稀释倍数和取样每个平板接种量换算出样品中的致病性副溶血弧菌量。

2 结果与分析

2.1 方法建立

2.1.1 PCR 扩增 选择 *stx* 基因作为靶基因,设计引物成功扩增出了特异性目的片段,该片段大小介于 500 bp 与 750 bp 片段之间,经测序其大小为 673 bp,用 Blast 与 NCBI 收录的副溶血弧菌进行同源性比对,同源性为 99%,此对引物可作为副溶血弧菌的特异性扩增使用。

2.1.2 菌落处理方法对菌落 PCR 的影响 比较 3 种不同的 PCR 前菌落处理方法,扩增结果表明,将菌落挑入装有 PCR 体系的 0.2 mL 薄壁管后,先在 -80 冷藏 10 min 再进行 PCR 的结果比先煮沸 10 min 再进行 PCR 或直接进行 PCR 效果要好,先加热再进行 PCR 与直接进行 PCR 无明显差别 (结果未显示),因此以下实验均先在 -80 冷藏 10 min,再进行 PCR 扩增。

2.1.3 菌落 PCR 退火温度及体系确定 与常规 PCR 不同,菌落 PCR 中 Taq 酶用量较大。当每个 25 μ L 体系中酶量小于 0.5 μ L 时,菌落 PCR 扩增不出目的片段;当酶量在 0.5 μ L 到 1.5 μ L 之间时,可扩增出目的片段,但不稳定;当酶量在 1.5 μ L 到 2 μ L 之间时,均可稳定的扩增出清晰的目的片段;基于扩增结果和节省试剂的考虑,将酶量定在每 25 μ L 体系中 1.5 μ L。最终菌落 PCR 体系为:引物各 2 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 2.5 U Taq 酶 1.5 μ L, 5 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 10 \times PCR buffer 2 μ L, 加灭菌 dH₂O 补足至 25 μ L。

梯度 PCR 的扩增结果见图 1, 47.3 扩增效果最好,47 次之,根据实验方便需要,最终确定 PCR 条件为:95 变性 5 min; 95 30 min, 47 30 s, 72 , 1 min, 25 个循环; 72 延伸 10 min; 4 保存。

用常规 PCR 和菌落 PCR 同时扩增副溶血弧菌毒力株,结果一致,见图 2。

2.2 菌落 PCR 方法检测致病性副溶血弧菌的特异性

对不同副溶血弧菌的标准株及其他菌株进行

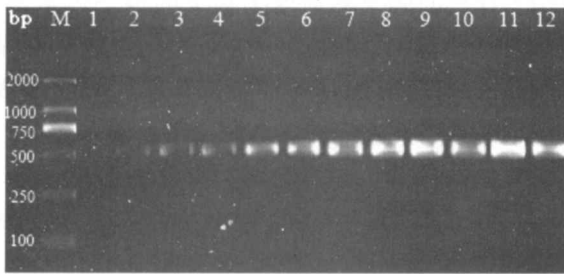


图1 副溶血弧菌标准株梯度 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR result of *Vibrio parahaemolyticus* standard strains under different annealing temperature (T_m).

M: DL2000 marker; 1: $T_m = 57^\circ\text{C}$; 2: $T_m = 56.8^\circ\text{C}$; 3: $T_m = 56.3^\circ\text{C}$; 4: $T_m = 55.5^\circ\text{C}$; 5: $T_m = 54.4^\circ\text{C}$; 6: $T_m = 53.0^\circ\text{C}$; 7: $T_m = 51.3^\circ\text{C}$; 8: $T_m = 49.8^\circ\text{C}$; 9: $T_m = 48.7^\circ\text{C}$; 10: $T_m = 47.9^\circ\text{C}$; 11: $T_m = 47.3^\circ\text{C}$; 12: $T_m = 47^\circ\text{C}$.

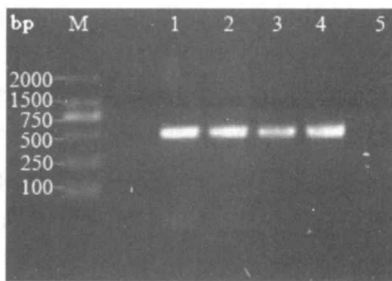


图2 副溶血弧菌用常规 PCR 和菌落 PCR 扩增结果

Fig.2 Colony PCR and conventional PCR results of *Vibrio parahaemolyticus*.

M: DL2000 marker; 1: CGMCC1.1997 常规 PCR 产物; 2: CGMCC1.2164 常规 PCR 产物; 3: CGMCC1.1997 菌落 PCR 产物; 4: CGMCC1.2164 菌落 PCR 产物; 5: 阴性对照

M: DL2000 marker; 1: Product of conventional PCR of CGM CC 1.1997; 2: Product of conventional PCR of CGMCC1.2164; 3: Product of colony PCR of CGMCC 1.1997; 4: Product of colony PCR of CGMCC1.2164; 5: Negative control.

菌落 PCR 检测和溶血性实验,结果见图 3。该方法能检测出可产生溶血现象的 CGMCC 1.1997 (从食物中分离)和 CGMCC 1.2164 (从患病鱼体中分离),在电泳图谱上有特征性的 673 bp 片段出现,而对非副溶血弧菌菌株或不产生溶血现象的副溶血弧菌环境分离株 CGMCC 1.1614,都不能检出。

2.3 菌落 PCR 法的灵敏度

菌落 PCR 中,反应体系中菌量只要达到 9.0×10^1 cfu/mL 就能扩增出目的片段 (见图 4)。菌落 PCR 的灵敏性很高,完全可以满足实验需求。



图3 菌落 PCR 检测副溶血弧菌的特异性

Fig.3 Specificity of colony PCR method detecting standard strains of *Vibrio parahaemolyticus*.

M: DL2000 marker; 1: *Vibrio parahaemolyticus* CGMCC1.1997; 2: *Vibrio parahaemolyticus* CGMCC1.2641; 3: *Vibrio parahaemolyticus* CGMCC1.614; 4: *Vibrio anguillarum* W-1; 5: *Vibrio anguillarum* DLP18; 6: *Vibrio alginolyticus* PX25; 7: *Vibrio splendidus* HS-17; 8: *Vibrio fluvialis* 927; 9: *Vibrio alginolyticus* CGMCC1.1833; 10: *Vibrio splendidus* HS-17; 11: 阳性对照, Positive control; 12: 阴性对照, Negative control.

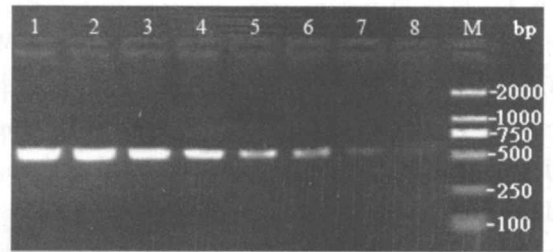


图4 菌落 PCR 检测副溶血弧菌 CGMCC1.1997 的灵敏度

Fig.4 Detection limit of colony PCR for *Vibrio parahaemolyticus* CGMCC1.1997.

M: DL2000 marker; 1: 9.6×10^8 cfu/mL; 2: 5.0×10^7 cfu/mL; 3: 2.3×10^6 cfu/mL; 4: 3.3×10^5 cfu/mL; 5: 1.2×10^4 cfu/mL; 6: 4.5×10^3 cfu/mL; 7: 2.3×10^2 cfu/mL; 8: 9.0×10^1 cfu/mL.

用 PC-PCR 法,对感染样品进行检测,其不同样品的检测低限见表 2,该方法的检测低限在 3.3×10^2 cfu/g 或 1.3×10^2 cfu/mL,能够满足检测需求。

2.3 人工感染养殖体系,检测副溶血弧菌的数量及分布状态

在室内环境模拟养殖环境,将致病性副溶血弧菌标准株投入养殖水体中,感染对虾 12 h,养殖对虾会出现明显病状。对虾肝胰腺中的副溶血弧菌量最大,平均在 7.50×10^7 cfu/g 水平,血液次之,肌肉中最少平均为 3.6×10^4 cfu/g。在养殖环境中,底泥中副溶血弧菌数量最高为 4.0×10^7 cfu/g 环境水体中平均为 5.7×10^7 cfu/mL。副溶血弧菌占对虾体内弧菌的 73.2%,占水体中弧菌的 58.3%,占底泥中的 46.7%。

表 2 PCR 方法检测样品中不同浓度副溶血弧菌的灵敏度

Table 2 Sensitivity of detection for different concentration of *Vibrio parahaemolyticus* in samples by PCR

样品种类 Sample types	PCR检测限 (cfu/g, cfu/mL)
	Limit of PCR (cfu/g, cfu/mL)
	副溶血弧菌 CGMCC 1.1997 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> CGMCC 1.1997
对虾肌肉 Shrimp muscle	4.9×10^2
对虾肝胰腺 Shrimp serum	3.3×10^2
对虾血液 Shrimp blood	2.4×10^2
池塘底泥 Pond sediment	3.1×10^2
池塘水样 Pond water	1.3×10^2

3 讨论

在传统的检验规程中,常采用我萼氏琼脂观察神奈川现象^[15]来评价副溶血弧菌的致病性(即溶血性试验)^[16],但溶血性试验费时费力,远不如用 PCR 方法检测菌株的毒力基因直接快速。目前 PCR 研究的靶基因多为热稳定直接溶血素(Thermostable direct hemolysin, TDH)基因 *tdh* 和类热稳定溶血素(IDH-related hemolysin, TRH)基因 *trh*,除这两种基因外,不耐热溶血毒素(Thermolabile hemolysin, TL) *tl* 基因,也被越来越多的为 PCR 检测所应用。编码 *TL* 的 *tl* 基因,长约 1.3 kb^[17]。据报道无论是临床分离株,还是环境分离株都含有 *tl* 基因^[18],且 *tl* 基因具有种的特异性,可以作为检测和监测致病性副溶血弧菌的依据^[19]。

菌落 PCR 要求在进行 PCR 扩增前,菌体裂解完全,使基因组 DNA 充分释放出来。目前,菌落 PCR 技术多应用于重组质粒筛选与鉴定中,其 PCR 反应的模板是电转后的大肠杆菌感受态细胞^[20],比较容易破壁释放 DNA,只需在 PCR 扩增前将菌体煮沸 5~10 min 或直接在冰上操作即可。副溶血弧菌与电转后的大肠杆菌感受态细胞相比,较难破壁,只有在极冷极热条件下,才能破坏细菌胞内平衡,释放出大量 DNA,满足 PCR 扩增的模板需求。菌落 PCR 模板量要远少于以纯 DNA 为模板的常规 PCR,因此菌落 PCR 反应中 Taq 酶用量要较常规 PCR 反应多出 3~4 倍才能满足扩增条件。本实验最终确定,在 PCR 扩增前

模板菌体在 -80 冷冻 10 min, 25 μ L 的 PCR 反应体系中 Taq 酶含量为 1.5 μ L,用菌落 PCR 法能够成功地扩增出目的片段。

常规 PCR 方法虽然快速,但不能检测活菌信息。传统副溶血弧菌的鉴定虽然能对活菌定量检测,但耗时耗力,需要 7 d 才能完成;基于 PCR 方法的检测样品中活菌的 MNP-PCR 法,整个过程也需要 16 h^[21]才能完成,而本方法从样品准备再到检出只要约 14 h,且要比 MPN-PCR 法定量更精确。PCR 方法,需要先提取样品中的 DNA 作为模板,才能进行定性、定量检测,而本方法省去了样品中 DNA 的抽提,使操作更加简单、大大降低了检测成本。而且能得到相应的细菌总数、弧菌总数、副溶血弧菌的百分比等相关信息,适用于养殖环境及水产动物中细菌的动态监测需求。本文建立的致病性副溶血弧菌快速、半定量的 PC-PCR 检测方法,为进一步开展水产养殖过程中副溶血弧菌的监测和污染源的追踪、监控提供了一定的技术基础。

参 考 文 献

- [1] Jiang X P, Chai T J. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1300 - 1305.
- [2] Spite G T. Isolation of an enteropathogenic, kanagawa positive strain of *Vibrio parahaemolyticus* from seabod implicated in acute gastroenteric [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1978, 35(6): 1226 - 1227.
- [3] 翟秀梅,王斌. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2007, 16(2): 162 - 168.
- [4] Kranz G E, Colwell R R, Lovelace E. *Vibrio parahaemolyticus* from the blue crab *Callinectes sapidus* in Chesapeake bay [J]. *Science*, 1969, 164: 1286 - 1287.
- [5] 鄢庆彬,苏永全,王军,等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究 [J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2001, 6(3): 191 - 196.
- [6] Joseph S W, Colwell R R, Kaper J B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios* [J]. *Crit Rev Microbiol*, 1982, 10(1): 77 - 124.
- [7] 寇运同,马洪明,刘晨光. 用 PCR 方法快速检测水产品中的副溶血弧菌 [J]. *海洋科学*, 2002, 26(9): 66 - 70.
- [8] Honda T, Mawatani T, Yabushita Y, et al. A novel method to chemically immobilize antibody on nylon and its application to the rapid and differential detection of two *Vibrio parahaemolyticus* toxins in a modified enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin. Diag. Lab. Immunol*, 1995, 2(2): 177 - 181.
- [9] Suthienkul O, Iida T, Park K S, et al. Restriction fragment length polymorphism of the *tdh* and *trh* genes in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. *J. Clin. Microbiol*, 1996, 34

- (5): 1293 - 1295.
- [10] Yamamoto K, Honda T, Mawatani T, et al. Enzyme-labeled oligonucleotide probes for detection of the genes for thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Can. J. Microbiol.*, 1992, 38(5): 410 - 416.
- [11] Lee C Y, Panicker G, Beja K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by covalink NH microwell plate sandwich hybridization [J]. *J. Microbiol Methods*, 2003, 53(2): 199 - 209.
- [12] Beja K, Patterson D P, Brasher C W, et al. Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tld and th [J]. *J. Microbiol Methods*, 1999, 36(3): 215 - 225.
- [13] Blackstone G M, Nordstrom J L, Vickery M C, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR [J]. *Microbiol Methods*, 2003, 53(2): 149 - 155.
- [14] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(22): 4692 - 4693.
- [15] Miyamoto Y, Kato T, Obara Y, et al. In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity [J]. *Bacteriology*, 1969, 100: 1147 - 1149.
- [16] Tison D L. 弧菌属. 见: Murray P R, Baron E J, Pfaller M A. 临床微生物学手册 [M]. 徐建国, 梁国栋, 邢来君, 等译. 北京: 科学出版社, 2005, 709 - 710.
- [17] Taniguchi S, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequence of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microbiol pathog.*, 1986, 1(5): 425 - 432.
- [18] Ellison R K, Malnati E, Depaola A, et al. Populations of *Vibrio parahaemolyticus* in retail oysters from Florida using two methods [J]. *J. Food Prot.*, 2001, 64(5): 682 - 686.
- [19] McCarthy S A, Depaola A, Cook D W, et al. Evaluation of alkaline phosphatase and digoxigenin labeled probes for detection of the thermolabile hemolysin (tlh) gene of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Lett Appl Microbiol.*, 1999, 28(1): 66 - 71.
- [20] 李华, 刘延. 菌落 PCR 技术在重组质粒筛选与鉴定中的应用 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2004, 32(9): 35 - 37.
- [21] 栾晓燕, 陈吉祥, 李筠, 等. MPN-PCR 法快速定量检测海产品中致病性副溶血弧菌 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(11): 1060 - 1061.

【新书推介】



《鱼类养殖生物学 (上下篇)》

李林春 主编 中国农业科学技术出版社

出版日期: 2007. 4

I S B N: 7-80233-264-8

定 价: 65.00 元

开 本: 16开

页 数: 514页

本书上编包括鱼类形态与机能、鱼类的生命周期和主要养殖鱼类生物学三部分。详细介绍了代表性鱼类的外部形态和内部结构特征、各系统和器官的解剖位置、形态与组织特征及其生理特征;重点介绍了主要养殖鱼类的胚前、胚胎和胚后 3 个发育阶段以及鱼的年龄、寿命与生长特征;本书还介绍了主要养殖鱼类的形态特征、

分类地位、地理分布、生物学特性及其经济意义。

本书下篇介绍了鱼类分类与鉴定的基本原理和方法以及各分类单元 (主要是养殖鱼类) 的主要特征、分布和经济意义。

本书适用于水产养殖专业,可供大专院校渔业环境保护、水产资源、生物学等专业的学生参考,同时也可作为水产养殖工作者的参考用书。