

## 仿刺参及养殖环境中溶藻弧菌和灿烂弧菌的 PCR 快速检测

汪笑宇, 周遵春, 关晓燕, 姜北, 陈仲, 董颖, 杨爱馥  
(辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**溶藻弧菌和灿烂弧菌是水产养殖中常见的致病菌,给水产动物的养殖带来巨大的损失,建立一种简便、快速、有效的检测方法十分必要。根据溶藻弧菌和灿烂弧菌 *gyrB* 基因序列的保守区序列分别设计引物,对 9 株溶藻弧菌和 6 株灿烂弧菌进行了 PCR 扩增。结果表明两对引物能特异地检测溶藻弧菌和灿烂弧菌,而与其他细菌没有交叉反应;检测溶藻弧菌的每个 PCR 反应的灵敏度为 0.13 pg 的 DNA 和  $10^3$  cfu/mL 细菌,检测灿烂弧菌的每个 PCR 反应的灵敏度为 0.34 pg 的 DNA 和  $10^3$  cfu/mL 细菌。该 PCR 检测方法具有特异性好、灵敏度高的特点,可用于对感染溶藻弧菌和灿烂弧菌的仿刺参及其养殖水体中的细菌性病原进行快速检测。

**关键词:**溶藻弧菌;灿烂弧菌;*gyrB* 基因;PCR;快速检测

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.03.22

中图分类号:S947.9

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2010)03-0125-06

## Rapid PCR Detection for *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* in Sea Cucumber *Apostichopus japonicus* and its Culturing Environment

WANG Xiao-Yu, ZHOU Zun-Chun, GUAN Xiao-yan, JIANG Bei,  
CHEN Zhong, DONG Ying, YANG Ai-fu  
(Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology,  
Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Dalian 116023, China)

**Abstract:** *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* strains are common bacterial pathogens, having a significant negative economic impact on aquaculture. It is necessary to establish a simple, rapid and effective detection method. According to the conserved sequence of *gyrB* gene of *V. alginolyticus* and *V. splendidus*, 2 pairs of primers were designed respectively to amplify 9 strains of *V. alginolyticus* and 6 strains *V. splendidus*. The results showed that the two pairs of primers could specifically detect *V. alginolyticus* and *V. splendidus*, but there is no specific band with bacteria which exist extensively in the culture of the sea cucumber. The minimum detectable amount of template was 0.13 pg/ $\mu$ L DNA or the lysed products of  $10^3$  cfu/mL of *V. alginolyticus*, and 0.34 pg/ $\mu$ L DNA or the lysed products of  $10^3$  cfu/mL of *V. splendidus*. This method had good specificity and high sensitivity. It was able to rapidly detect *V. alginolyticus* and *V. splendidus* in sea cucumber and its culturing environment.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio splendidus*; *gyrB*; PCR; rapid detection

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 和灿烂弧菌 (*V. splendidus*) 是水产养殖业中常见的致病菌<sup>[1~6]</sup>,对水生动物包括鱼类、双壳贝类、甲壳类和棘皮动物等的养殖造成了巨大的损失<sup>[6~10]</sup>,溶

藻弧菌对人的临床感染也屡见报道<sup>[1,4~6,11,12]</sup>,灿烂弧菌还可作为致病微生物之一与病毒等同时致使双壳贝类等发病,而能否尽早发现和检测细菌是有效预防相关疾病的关键因素。因此,建立一

收稿日期:2010-01-06;修回日期:2010-02-23

基金项目:国家海洋公益项目(200705007)资助。

作者简介:汪笑宇,硕士,研究方向为海洋生物病害。E-mail:smallouc@163.com。通讯作者:周遵春,研究员,博士,研究方向为海洋生物技术。E-mail:zunchun@hotmail.com

种快速准确的病原检测技术是十分必要的。

传统的细菌检测手段包括细菌的分离培养、形态观察、生理生化检测和选择培养基培养等,这些常规方法通常需要24~72 h才能获得较为确切的结果。PCR方法是近年来发展起来的新型诊断技术,这种技术快速、灵敏,在临床微生物检测方面获得了极为广泛的应用。目前,利用PCR技术等分子生物学手段检测弧菌的主要靶基因有16S rRNA基因<sup>[13,14]</sup>、IGSs序列<sup>[15]</sup>、*hsp60*<sup>[15]</sup>、*toxR*<sup>[16]</sup>、*vhhA*<sup>[17]</sup>、*gyrB*<sup>[18,19]</sup>和*ftsZ*<sup>[20]</sup>等。利用PCR技术对病原菌进行检测,需要选择种内保守、种间有差异的特异性引物对。在弧菌属细菌中,由于某些种的核糖体DNA差异极小,因而核糖体DNA不是理想的扩增目标。Stackebrandt等<sup>[21]</sup>认为16S rRNA序列同源性分析比较适合与属以上的分类阶元间亲缘关系的研究,而对于属以下的分类单位,其分辨率明显不足。而*gyrB*基因在细菌中广泛存在,并且其碱基替换频率较高<sup>[14]</sup>,作为蛋白质编码基因所固有的遗传密码子的兼并性使其DNA序列可发生较多替换而不改变氨基酸序列,因此特别适合亲缘关系较近的菌种的区别和鉴定。本研究针对*gyrB*基因的种内保守区设计种间差异的特异性引物,建立了一种特异、敏感的溶藻弧菌和灿烂弧菌的PCR检测方法,为水生生物尤其是仿刺参的细菌性病原的快速检测提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) L12、Lsv42,哈氏弧菌(*V. harveyi*) 1601和灿烂弧菌(*V. splendidus*) 1604为中国科学院海洋研究所赠送;温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、嗜水汽单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)为华中农业大学赠送;溶藻弧菌RZ001、RZ002为上海水产大学赠送。灿烂弧菌04301、ctt、0605、0326、HS003;溶藻弧菌2603、08071、08072、0919A、HS713;塔斯马尼亚弧菌(*V. tasmaniensis*) 04102;副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) 1599, *V. cyclitrophicus* 0902A、HD6262, *V. pomeroiyi* HS711;鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*) 08073;发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*) 04104;交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) 0302;枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) 716分离于患化

皮病仿刺参或其养殖水体,经鉴定后保存于-80℃。

### 1.2 细菌基因组的提取

细菌于2216E平板28℃培养24 h。挑取单一菌落悬浮于50 μL无菌去离子水中,100℃水浴煮沸10 min,冷却后4℃、12 000 r/min离心10 min,上清液即为PCR扩增反应的模板。

### 1.3 引物设计

由GenBank获取溶藻弧菌和灿烂弧菌的*gyrB*基因序列,去掉较短序列以及个别干扰序列,得到1 000 bp以上的序列;同时获取其他弧菌属细菌的*gyrB*基因序列,将上述所得序列进行多序列比对分析,从弧菌属*gyrB*基因序列的保守区筛选溶藻弧菌和灿烂弧菌不同于其他种弧菌的变异位点,从这些位点设计得到引物。

溶藻弧菌引物: ValF-*gyrB*: 5'-TGCGCTAACACGTACATTGAACAG-3', ValR-*gyrB*: 5'-CACCCATTGCAGACTCAACA-3',扩增片段大小204 bp;灿烂弧菌引物: VspF-*gyrB*: 5'-ACCAACAAAA-CACCRATYATYC-3', VspR-*gyrB*: 5'-ATCACCYGATGTTGMWGTCTTC-3',扩增片段大小252 bp。

### 1.4 PCR反应

PCR反应体系20 μL: 10 × PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> 15 mmol/L) 2.0 μL, 10 mmol/L 4 × dNTPs(各2.5 mmol/L) 1.6 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.8 μL, *Taq* DNA聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL,模板DNA 1.2 μL,加水至20.0 μL。

PCR反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,31个循环;72℃ 6 min。PCR产物取5 μL,经1%琼脂糖凝胶在110 V电压下电泳30 min后,用凝胶成像系统观察并照相记录。

回收并纯化PCR产物,连接至pMD-19T载体,转化至感受态*E. Coli* Top10菌株中,经含氨苄青霉素平板筛选阳性重组菌,送上海生工生物工程有限公司测序。

### 1.5 PCR的特异性检测

以9株溶藻弧菌和6株灿烂弧菌DNA为标准株模板与以上其他种细菌DNA模板,进行PCR扩增,以灭菌超纯水为空白对照,电泳上样量为5 μL检测PCR反应的特异性。

### 1.6 PCR的敏感性检测

以溶藻弧菌08072和灿烂弧菌04301为标准株,2216E液体培养基中过夜培养,1.5%生理盐水洗涤,以麦氏比浊法将菌液浓度调至10<sup>8</sup> cfu/

mL,依次 10 倍梯度稀释,用 TaKaRa 细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒制备各梯度细菌 DNA 模板,每 20  $\mu\text{L}$  反应体系中各加 1.2  $\mu\text{L}$  模板进行 PCR 扩增,以灭菌超纯水为空白对照。

取溶藻弧菌和灿烂弧菌细菌 DNA 模板用 Implen NanoPhotometer 微量光度计测定模板浓度并依次 10 倍梯度稀释,以灭菌超纯水为空白对照。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,能出现电泳条带的最低模板量定为 PCR 检测的最低限。

### 1.7 仿刺参样品病原菌检测

取患化皮病仿刺参溃烂的病灶组织,不分离细菌,直接用无菌 1.5% 生理盐水匀浆,100 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,迅速置于冰上冷却 5 min,取上清液作为模板;取患化皮病仿刺参养殖水体,灭菌滤纸过滤水体,滤液取 100  $\mu\text{L}$  涂布于 2216E 培养基,28 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养,得到的细菌用 1.5% 生理盐水冲洗,100 $^{\circ}\text{C}$  煮沸 10 min,取上清液作为模板,PCR 方法对其进行检测。以纯化的溶藻弧菌和灿烂弧菌分别作为对照,注射生理盐水的仿刺参组织 DNA 为阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 PCR 检测的特异性

以引物对 ValF-*gyrB*/ValR-*gyrB* 对 9 株溶藻弧菌和 14 株其他细菌进行 PCR 扩增,9 株不同来源的溶藻弧菌均检测到与预期一致的 DNA 片段,而其他细菌未扩增到目的片段,表明该引物能特异性地检测溶藻弧菌(图 1)。以引物对 VspF-*gyrB*/VspR-*gyrB* 对 6 株灿烂弧菌和 14 株其他细菌进行 PCR 扩增,6 株灿烂弧菌均检测到与预期一致的 DNA 片段,而其他细菌未扩增到目的片段,说明该引物能特异性地检测灿烂弧菌(图 2)。

### 2.2 PCR 检测的敏感性

溶藻弧菌 PCR 电泳检测敏感性结果如图 3。由图可见,溶藻弧菌菌液浓度为  $10^3 \sim 10^6$  cfu/mL、DNA 浓度为 0.13  $\mu\text{g}/\mu\text{L} \sim 1.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  时可看到目的条带,空白对照均无条带。PCR 电泳检测溶藻弧菌细菌浓度极限为  $10^3$  cfu/mL, DNA 检出

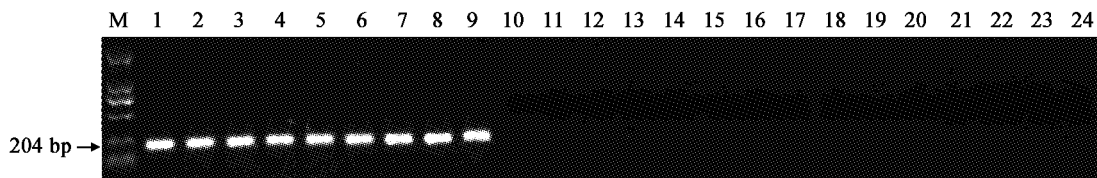


图 1 溶藻弧菌 PCR 反应特异性电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results for PCR detection specificity of *V. alginolyticus*.

M:DL2000 ladder; 1~9. *V. alginolyticus* RZ001, RZ002, L12, Lsv42, 08071, 08072, 0919A, 2603, HS713; 10~11. *V. splendidus* 1604, 04301; 12. *V. harveyi* 1601; 13. *V. tasmaniensis* 04102; 14. *V. parahaemolyticus* 1599; 15~16. *V. cyclitrophicus* 0902A, HD6262; 17. *V. pomeroiyi* HS711; 18. *Listonella anguillarum* 08073; 19. *Aeromonas sobria*; 20. *Aeromonas hydrophila*; 21. *Photobacterium phosphoreum* 04104; 22. *Pseudoalteromonas* sp. 0302; 23. *Bacillus subtilis* 716; 24. 对照 Control

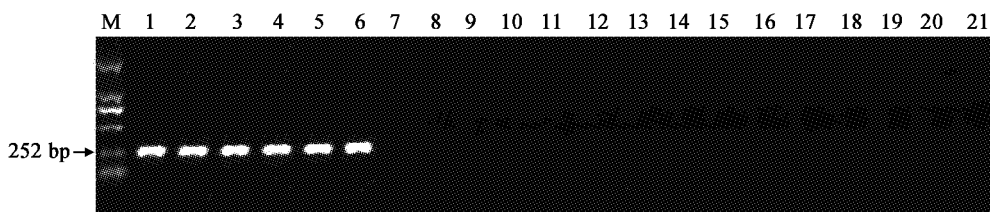


图 2 灿烂弧菌 PCR 反应特异性电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results for PCR detection specificity of *V. splendidus*.

M:DL2000 ladder; 1~6. *Vibrio splendidus* 1604, 04301, ctt, 0605, 0326, HS003; 7~8. *V. alginolyticus*. 08072, RZ002; 9. *V. harveyi* 1601; 10. *V. tasmaniensis* 04102; 11. *V. parahaemolyticus* 1599; 12~13. *V. cyclitrophicus* 0902A, HD6262; 14. *V. pomeroiyi* HS711; 15. *Listonella anguillarum* 08073; 16. *Aeromonas sobria*; 17. *Aeromonas hydrophila*; 18. *Photobacterium phosphoreum* 04104; 19. *Pseudoalteromonas* sp. 0302; 20. *Bacillus subtilis* 716; 21. 对照 Control

极限为  $0.13 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。灿烂弧菌 PCR 电泳检测灵敏度结果如图 4。由图可见,灿烂弧菌菌液浓度为  $10^3 \sim 10^5 \text{ cfu}/\text{mL}$ 、DNA 浓度为  $0.34 \sim 3.4 \text{ pg}/\mu\text{L}$  时可看到目的条带,空白对照均无条带。PCR 电泳检测灿烂弧菌菌液浓度极限为  $10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ , DNA 检出极限为  $0.34 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。

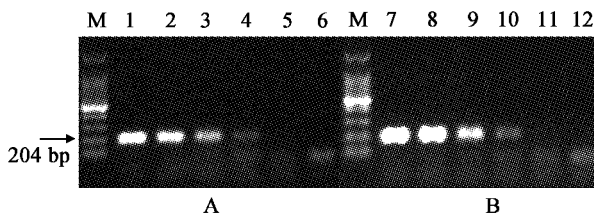


图 3 溶藻弧菌细菌数量和 DNA 浓度 PCR 检测敏感性电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis results for PCR detection sensitivity of *V. alginolyticus* bacterial number and genome DNA concentration.

A. 溶藻弧菌细菌数量; B. 溶藻弧菌细菌 DNA 浓度  
A. Bacterial number of *V. alginolyticus*; B. Genome DNA concentration of *V. alginolyticus*  
M: 100 bp ladder; 1:  $10^6 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 2:  $10^5 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 3:  $10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 4:  $10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 5:  $10^2 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 6: 对照 Control. 7:  $1.3 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 8:  $130 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 9:  $13 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 10:  $1.3 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 11:  $0.13 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 12: 对照 Control.

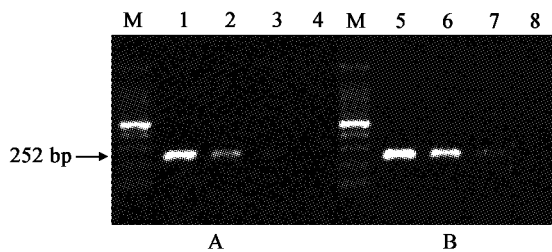


图 4 灿烂弧菌细菌数量和 DNA 浓度 PCR 检测敏感性电泳结果

Fig. 4 Electrophoresis results for PCR detection sensitivity of *V. splendidus* bacterial number and genome DNA concentration.

A. 灿烂弧菌细菌数量; B. 灿烂弧菌细菌 DNA 浓度  
A. Bacterial number of *V. splendidus*; B. Genome DNA concentration of *V. splendidus*.  
M: 100 bp ladder; 1:  $10^5 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 2:  $10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 3:  $10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ ; 4: 对照 Control; 5:  $3.4 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 6:  $0.34 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 7:  $0.034 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ; 8: 对照 Control

### 2.3 仿刺参及其养殖水体样品的 PCR 检测结果

利用 PCR 方法直接检测患化皮病仿刺参溃烂组织及养殖水体。结果显示,两对引物均可在仿刺参溃烂组织及养殖水体中有效检测到特异 DNA 片段。

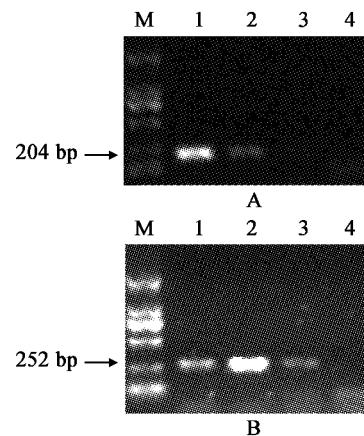


图 5 PCR 检测仿刺参及水体样品电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis results for detection of DNA from diseased *Apostichopus japonicus* and the cultured water.

A. PCR 检测溶藻弧菌; B. PCR 检测灿烂弧菌  
A. PCR detection of *V. alginolyticus*; B. PCR detection of *V. splendidus*  
M: DL2000 ladder; 1: 阳性对照 Positive control; 2: 发病海参组织 Infected tissues; 3: 养殖水样 The cultured water; 4: 阴性对照 Negative control.

## 3 讨论

溶藻弧菌和灿烂弧菌是水产养殖中较为常见、流行性较广、危害性较为严重的细菌性病原。在海水及河口处大量存在,不仅对水产动物有很强的致病性,对人类的健康也能造成一定威胁。本研究根据溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和灿烂弧菌(*V. splendidus*)*gyrB* 基因保守区各设计了 1 对特异性引物。通过实验中所建立的 PCR 方法检测到与预期产物大小一致的溶藻弧菌和灿烂弧菌的扩增片段,可以特异性地检测到所有的 9 株溶藻弧菌和 6 株灿烂弧菌,而在其他种株细菌中没有扩增到目的 DNA 片段。实验中选取的细菌除了赠送的菌株外,均为实验室从患病参体壁、内脏或其养殖水体中分离鉴定得到,具有一定的代表性,可以说明该方法对仿刺参养殖中溶藻弧菌和灿烂弧菌具有较好的检测特异性。本实验建立的 PCR 检测技术,不仅敏感度高、特异性强,而且耗时少,对于纯病原的检测不到 3 h 就可以得到结果,对于及时确定病原菌及进行病害预警有一定的帮助。

本研究中所定位的靶基因为 *gyrB* 基因,编码 DNA 促旋酶的 B 亚单位蛋白,据报道可在种的水平确认新的分类单元,也能较稳定准确地区分弧菌科主要病原菌,具有作为快速诊断芯片系统靶

分子的潜力<sup>[22]</sup>。副溶血弧菌的 16S rRNA 基因序列与溶藻弧菌高度相似(相似度 98%),极其不易区分<sup>[23]</sup>,本研究中根据 *gyrB* 基因设计的引物能有效地将二者区分开。*V. pomeroyi*、*V. tasmaniensis* 和 *V. splendidus* 在遗传距离上非常接近,同属于类灿烂弧菌菌群,通过常规生理生化鉴定和 16S rDNA 系统学分析难以区分<sup>[24]</sup>,本实验中设计的引物能有效区分这两种弧菌与灿烂弧菌,说明 *gyrB* 基因在类灿烂弧菌菌群的区分中有一定效用,Roux 等<sup>[25]</sup>也通过建立 *gyrB* 基因系统发育树表明 *gyrB* 基因可以有效区分类灿烂弧菌菌群中的 *V. chagasii*、*V. pomeroyi* 和 *V. tasmaniensis*。

张世秀<sup>[23]</sup>根据溶藻弧菌的 *gyrB* 基因序列设计了扩增片段为 372 bp 的特异性引物,以此研制出了溶藻弧菌的 PCR 快速检测试剂盒,其受检溶藻弧菌分离自病虾。Zhou 等<sup>[26]</sup>根据溶藻弧菌的 *gyrB* 基因序列设计引物进行了实时荧光定量 PCR,检测灵敏度为  $10^2$  cfu/mL,主要针对自然海水,本研究首次针对仿刺参及其养殖水体中的菌群结构进行溶藻弧菌和灿烂弧菌的特异检测。Kumar 等<sup>[19]</sup>通过 PCR 扩增 *gyrB* 基因检测创伤弧菌的细菌数量的检测灵敏度为  $3 \times 10^2$  cfu/g。张凤萍等<sup>[10]</sup>根据灿烂弧菌 16S ~ 23S rDNA 间隔区序列设计了 1 对特异性引物,其 DNA 检出极限为  $0.5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ,与本试验中结果相似。由此可见,本试验建立的 PCR 方法具有较高的敏感度。本研究对于细菌数量的检测灵敏度为  $10^3$  cfu/mL,据报道大多数致病菌感染剂量(进入机体量)超过  $10^3$  cfu 才能引起疾病发生<sup>[27]</sup>,本实验的 PCR 检测灵敏度等于致病菌的感染剂量,在化皮海参的溃烂组织及养殖水体中都检测到了溶藻弧菌和灿烂弧菌的存在。因此这种方法可用于仿刺参疾病的早期预防诊断,具有较好的特异性和快捷性。

本研究中 PCR 检测方法也存在一些不足,如检测每一种病原菌都采用了各自独特的引物,因此每次反应只能确定一种病原菌的有或无,这种“一对一”的模式不适合检测混合感染的复杂样品,如何通过一次反应监测多种目标病原还需要进一步的探讨。

#### 参 考 文 献

[1] Reina J, Heravs J. Otitis medii due to *Vibrio alginolyticus*: the risks of the Mediterranean sea[J]. An. Esp. Pediatr., 1993, 39:361-363.

- [2] Hervio D, Colwell R, Derrien A, et al.. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France[J]. J. Appl. Microbiol., 2002, 92:1123-1135.
- [3] George R, John R, Iyappan T, et al.. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting[J]. Lett. Appl. Microbiol., 2004, 40:369-372.
- [4] Levine C, Griffin M. Vibrio infections on the gulf coast: results of four year of regional surveillance. Gulf coast Vibrio working group[J]. J. Infect. Dis., 1993, 167:479-483.
- [5] Gahrn-Hansen B, Hornstrup M K. Extraintestinal infections caused by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* at the country of Funen 1987-1992[J]. Ugeskr. Laeg., 1994, 156:5279-5282.
- [6] Gomez J, Villamil L, Lemos L, et al.. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71:98-104.
- [7] Anderson G, Shamsudin N, Shariff M, et al.. Bacterial septicaemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds[J]. Asian. Fish. Sci., 1998, 2:93-108.
- [8] Neelson H, Wimpee B, Wimpee C. Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from Persian Gulf and Kuwait region with *LuxA* probes[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59:2684-2689.
- [9] Gatesoupe J, Lambert C, Nicolas L. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*[J]. J. Appl. Microbiol., 1999, 87:757-763.
- [10] 张凤萍,王印庚,李胜忠,等.应用 PCR 方法检测刺参腐皮综合征病原——灿烂弧菌[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(5):100-106.
- [11] 侯霄煜.由溶藻弧菌引起的一起食物中毒[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9):1123.
- [12] 赵初环,李惠萍,卢中秋,等.溶藻弧菌脓毒症 1 例[J]. 中国微生物杂志, 2005, 17(5):382.
- [13] 李宁求,白俊杰,吴淑勤,等.斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定[J]. 水产学报, 2005, 29(3):456-361.
- [14] 胡学峰,石存斌,潘厚军,等.海水养殖斜带石斑鱼溃疡病病原菌的初步研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(2):232-236.
- [15] 邓先余.6 种水产病原菌 16 ~ 23 区间序列分析及检测技术[D]. 广州:中山大学,博士学位论文, 2003, 5.
- [16] Diana R, Rafioa, Cynthia T, et al.. Sequence analysis of partial *toxR* gene from Philippine *Vibrio* isolates and design of *toxR*-targeted primers for detection[J]. J. Gen. Appl. Microbiol., 2005, 51:343-351.
- [17] 吴增辉,楼永良,卢中秋,等.基于 *vnhA* 基因 TaqMan 实时荧光定量 PCR 快速检测创伤弧菌的研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(5):477-481
- [18] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Appl. Environ. Microbiol., 1995,

- 61;1101 - 1109.
- [19] Kumar S, Parvathi A, Karunasagar I, *et al.*. A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths [J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 111:216 - 220.
- [20] Dobryan M, Paul G, Adam B, *et al.*. Rapid detection of *Vibrio* species using liquid microsphere arrays and real-time PCR targeting the *ftsZ* locus[J]. *J. Med. Microbiol.*, 2007, 56:56 - 65
- [21] Stackebrandt E, Liesack W, Goebel M. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis[J]. *FASEB J.*, 1993, 7:232 - 236.
- [22] 侯晓丽,曹清毅,潘劲草,等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46: 884 - 889.
- [23] 张世秀. 四种弧菌 *gyrB* 基因的克隆和溶藻弧菌快速检测试剂盒的研制[D]. 海口:海南大学,硕士学位论文,2006,5.
- [24] 刘泳. 弧菌属 16S 核糖体 RNA 基因特异引物的设计优化及其在胶州湾海洋弧菌菌群结构分析中的应用[D]. 青岛:中国海洋大学,硕士毕业论文,2005.
- [25] Roux L, Gay M, Lambert C, *et al.*. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequence[J]. *Dis. Aqu. Org.*, 2004, 58:143 - 150.
- [26] Zhou S, Hou Z, Li N, *et al.*. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood[J]. *J. Applied Microbiol.*, 2007, 103:1897 - 1906.
- [27] U S E P A. United States Environmental Protection Agency [M]. Washington: Washington State Department of Ecology, 1992.

## 2010 年食品绿色化加工技术与食品安全 博士生学术论坛会议通知

全国博士生学术论坛由国务院学位委员会办公室、教育部学位管理与研究生教育司主办。本届博士论坛由华南理工大学承办,诚意邀请来自两岸四地及海内外的研究生参与此次论坛,共同交流食品绿色化加工新技术的研究进展,讨论食品安全的焦点问题。

华南理工大学是直属教育部的全国重点大学,秉承前五届博士论坛的成功经验,发挥现有的自身优势,将为全国的食品生物类博士生提供一个高水平的学术交流平台,通过创造一个良好的学术氛围以促进博士生们的相互交流。博士生是我国科研事业的未来栋梁,此次论坛也为增强现代博士生的专业素养、提升博士生的科研意识提供了契机,促进博士生培养质量的不断提高,以真正促进我国科研事业的发展。

### 一、时间、地点:

2010 年 7 月 12 ~ 14 日,华南理工大学

### 二、会议主题:

食品生物技术与安全

### 三、会议专题:

1. 食品安全控制与检测技术
2. 绿色化食品加工
3. 食品生物技术
4. 传统食品工业化
5. 功能性食品与添加剂

### 四、征文要求:

本次会议将甄选优秀的会议论文入选《现代食品科技》增刊,投稿地址及征稿信息详见论坛网站 <http://www.foodforum2010.com/>

### 五、联系方式:

地 址:广州市天河区五山路 381 号  
华南理工大学轻工与食品学院

邮 编:510640

联系人:邝兆明,彭 尧

电 话:020-87111910

020-87111008