

## 应用双抗体夹心酶联免疫方法检测仿刺参病原菌 ——黄海希瓦氏菌 AP629

吴秋仙, 李强, 李华, 王轶南

(大连海洋大学, 农业部海洋水产增养殖学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:**“化皮病”是当前仿刺参养殖的最严重的疾病,导致大量死亡,严重影响我国水产养殖的经济效益。以仿刺参病原菌——黄海希瓦氏菌(*Shewanella smarflavi*) AP629 兔源多克隆抗体和鼠源单克隆抗体 3D9 分别作为包被抗体和检测抗体,建立了黄海希瓦氏菌 AP629 的双抗体夹心 ELISA 快速检测方法。多克隆抗体和单抗 3D9 的最佳稀释倍数分别为 1:400 和 1:80,该方法特异性强,与弧菌、气单胞菌、爱德华氏菌、大肠杆菌等均无交叉反应,检测灵敏度高。以 PBS 和仿刺参体壁匀浆上清液为悬菌介质的最低检出限分别为  $10^4$  cells/mL 和  $10^6$  cells/mL。对人工感染黄海希瓦氏菌的 10 头仿刺参进行检测,其检测结果均为阳性,稳定性和重复性良好。该方法的建立有助于快速准确地诊断由黄海希瓦氏菌 AP629 引起的仿刺参疾病。

**关键词:**黄海希瓦氏菌;双抗体夹心 ELISA;检测

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2011.01.19

中图分类号:S947.9

文献标识码:A

文章编号:1008-0864(2011)01-0117-05

## Detection of *Shewanella smarflavi* AP629 by Double-antibody Sandwich ELISA Method

WU Qiu-xian, LI Qiang, LI Hua, WANG Yi-nan

(Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mari-culture, Ministry of Agriculture, Liaoning Dalian 116023, China)

**Abstract:** At present, skin ulceration syndrome is the most serious disease in *Apostichopus japonicus* aquaculture. It caused mass mortality and great economic losses for aquaculture in China. A double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was developed for rapidly detecting *S. smarflavi* (AP629), a pathogen of *Apostichopus japonicus*, using polyclonal antibody (pAb) from rabbit and monoclonal antibody 3D9 (mAb 3D9) from mouse against AP629. The optimal dilution of pAb and mAb 3D9 were 1:400 and 1:80, respectively. This method has strong specificity, no cross reaction with other bacteria, including *Vibrio* sp., *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Escherichia coli* etc., and high sensitivity in detection. The lowest concentration of strain AP629 that can be detected was  $10^4$  cells/mL and  $10^6$  cells/mL, respectively using PBS and homogenate of body wall from *A. japonicus* as medium. 10 artificial infected *A. japonicus* samples were detected and 100% of them were positive. So it has better stability and repetition. This method is very helpful for rapid and accurate diagnosis of *A. japonicus* infected by *S. smarflavi* AP629.

**Key words:** *Shewanella smarflavi*; double-antibody sandwich ELISA; detection

仿刺参是我国北方沿海地区海水养殖中产值最大的一个品种。近几年来,随着养殖规模的迅速扩张及生产过程中的不规范操作,养殖仿刺参疾病发生严重,导致大量死亡,其中“化皮病”是目前流行最严重的疾病。该病主要由细菌感染所

致<sup>[1~6]</sup>,黄海希瓦氏菌(*shewanella smarflavi*)是引起大连地区仿刺参化皮病的重要病原菌<sup>[7]</sup>。目前针对黄海希瓦氏菌的诊断主要依靠传统的细菌学手段来完成,不仅耗时久,且需要特殊的技术,容易延误治疗时机。双抗体夹心酶联免疫

收稿日期:2010-11-01;接受日期:2010-12-09

基金项目:国家自然科学基金项目(30800853);“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD09A01);国家专项(908-01-ZH3);辽宁省海洋与渔业厅项目(201005)资助。

作者简介:吴秋仙,硕士研究生,主要从事水产动物疾病学研究。E-mail:wuqixian91@126.com。通讯作者:李强,副教授,博士,研究方向为水产动物病害与免疫。E-mail:liqiang@dlou.edu.cn

(ELISA)吸附技术具有特异性强、灵敏度高和检测时间短等优点,现已在水产动物病原快速检测中广泛应用。王崇明等<sup>[8]</sup>建立了皱纹盘鲍脓足病致病病原——创伤弧菌的双抗体夹心酶联免疫检测技术,其特异性强,检测灵敏度达  $10^4$  cells/mL;程顺峰<sup>[9]</sup>利用淋巴囊肿病毒单克隆和多克隆抗体建立了淋巴囊肿病毒的双抗体夹心酶联免疫检测技术,可用于养殖牙鲆淋巴囊肿病毒的检测。孙学强等<sup>[10]</sup>利用兔源和羊源抗血清建立了河蟹“颤抖病”病毒的双抗体夹心酶联免疫检测技术,应用此技术进行病蟹和市场购买河蟹病原的检测,其阳性检出率为 66.7%~100%。

本研究在已获得抗黄海希瓦氏菌兔源多克隆抗体和鼠源单克隆抗体的基础上,建立了该病原的双抗体夹心 ELISA 检测技术,以期为该病的诊断提供快速准确的技术。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料及试剂

黄海希瓦氏菌 (*Shewanella smarflavi*) AP629 分离于大连地区患“化皮病”的仿刺参。鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) HUF 5001、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) ATCC 29306、哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) ATCC 14126、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) KCCM 40513、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) KCTC 2471、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 29532、杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) MT 004、鲶爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*) ATCC 33202 标准菌株均由韩国釜庆大学疾病预防实验室提供。

黄海希瓦氏菌 AP629 兔源多克隆抗体(效价 1:32 768)和鼠源单克隆抗体 3D9(效价 1:512)由本实验室制备,碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗小鼠 Ig、对硝基苯磷酸盐(pNPP)购于Sigma公司。

### 1.2 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

**1.2.1 双抗体夹心 ELISA 操作流程** 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(15 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6)稀释抗黄海希瓦氏菌 AP629 多克隆抗体,加入到 96 孔聚苯乙烯酶标板反应孔内(100  $\mu\text{L}$ /孔),4 $^\circ\text{C}$  过夜后,PBST(0.13 mol/L  $\text{NaCl}$ , 2.7 mmol/L  $\text{KCl}$ , 1.5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

8.1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.05% Tween 20, pH 7.4)洗涤 3 次;每孔加入 200  $\mu\text{L}$  3% 的牛血清白蛋白(PBS 配制),37 $^\circ\text{C}$  封闭 1 h;PBST 洗 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  AP629 菌悬液,以 PBS 作为阴性对照,37 $^\circ\text{C}$  孵育 1 h;PBST 洗 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  单克隆抗体 3D9,37 $^\circ\text{C}$  孵育 1 h;PBST 洗涤 3 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗小鼠 Ig(1:1 000),37 $^\circ\text{C}$  孵育 1 h;PBST 洗涤 3 次,加入 100  $\mu\text{L}$  3.8 mmol/L pNPP 显色液(15 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0.53 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 3.8 mmol/L pNPP-Na),暗反应 5~20 min,每孔加入 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L 的 NaOH,稳定 3~5 min。酶标仪读取 405 nm 处的 OD 值,计算加菌悬液孔与加 PBS 孔光吸收值之比(P/N),当 P/N  $\geq 2.1$  时为阳性。

**1.2.2 抗体最佳工作浓度的确定** 将多克隆抗体从 1:100 至 1:6 400 作 2 倍比系列稀释,包被酶标板,单抗从原液、1:5 至 1:1 280 做 2 倍比系列稀释,AP629 菌悬液浓度为  $5 \times 10^8$  cells/mL,参照 1.2.1 所述方法采用棋盘滴定试验确定多克隆抗体和单克隆抗体的最佳工作浓度。

**1.2.3 特异性试验** 用浓度均为  $5 \times 10^8$  cells/mL 的黄海希瓦氏菌 AP629 与哈维氏弧菌、副溶血弧菌和杀鲑气单胞菌等 9 种标准菌株做抗原检测,多克隆抗体和单克隆抗体均采用最佳工作浓度,按照 1.2.1 所述方法进行特异性试验。

**1.2.4 敏感性试验** 将黄海希瓦氏菌 AP629  $5 \times 10^9$  cells/mL 用无菌 PBS 进行 10 倍比系列稀释,多克隆抗体和单克隆抗体均采用最佳工作浓度,以 PBS 替代菌悬液作为阴性对照,AP 标记的羊抗小鼠 Ig 作 1:1 000 稀释,按照 1.2.1 所述方法进行敏感性试验,确定可检测的最低抗原浓度。

取体表光泽鲜艳、对外来刺激反应敏感、参体舒展坚挺、疣足尖锐和触手伸缩自如的仿刺参体壁,用无菌的 PBS 冲洗后,以 20 倍体积的 PBS 进行匀浆,离心(1 500 r/min, 5 min)取上清。以体壁匀浆上清作为稀释介质,通过血球计数板计数获得的 AP629 菌悬液( $5 \times 10^{10}$  cells/mL, PBS 重悬),进行 10 倍比稀释,使其终浓度分别为  $50 \sim 5 \times 10^9$  cells/mL。用双抗体夹心 ELISA 法检测,以不含菌株 AP629 的体壁匀浆上清液作为阴性对照;另外将上述样品 28 $^\circ\text{C}$  恒温培养 24 h 后,再次用双抗体夹心 ELISA 法进行检测。

### 1.3 仿刺参“化皮”体壁中黄海希瓦氏菌的检测

用体壁注射方式进行仿刺参(体长 8~9 cm)的人工感染试验,注射用黄海希瓦氏菌 AP629 浓度为  $5 \times 10^8$  cells/mL,4 点注射,每点注射 100  $\mu$ L,共注射 10 头,对照组注射等量生理盐水。24 h 后,感染组仿刺参出现不贴壁,体表注射点出现化皮,甚至死亡,对照组仿刺参无任何异常反应。切取病参化皮处和对照参体壁,用无菌 PBS 冲洗后,以 20 倍体积的 PBS 进行匀浆。体壁的匀浆液经低速离心(1 500 r/min,5 min)取上清,100  $\mu$ L/孔在酶标板中进行包被,双抗体夹心 ELISA 方法进行检测。

## 2 结果

### 2.1 抗体最佳工作浓度的确定

多抗最适包被浓度和单抗最适工作浓度如

表 1 多抗最适包被浓度和单抗最佳工作浓度的确定

Table 1 Determination of optimum polyclonal antibody and monoclonal antibody concentration.

多抗稀释度 <i>pAb</i> concentration	单抗稀释度 <i>mAb</i> concentration									
	1:1	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280
1:100	2.451	2.426	2.393	1.863	1.565	1.441	1.216	1.002	0.938	0.924
1:200	2.171	1.645	1.565	1.415	1.408	1.35	1.191	0.876	0.643	0.525
1:400	1.361	1.282	1.25	1.122	1.072	0.997	0.845	0.797	0.421	0.353
1:800	0.938	0.946	0.903	0.869	0.728	0.672	0.543	0.359	0.334	0.317
1:1 600	0.924	0.911	0.893	0.845	0.677	0.654	0.512	0.347	0.294	0.284
1:3 200	0.755	0.717	0.704	0.653	0.604	0.588	0.510	0.289	0.254	0.265
1:6 400	0.753	0.694	0.687	0.639	0.598	0.563	0.447	0.257	0.243	0.195

表 2 双抗体夹心酶联免疫方法的特异性检测

Table 2 Identification of specificity of double-antibody sandwich ELISA.

菌株名称 Strain species	<i>P/N</i> 值 <i>P/N</i> value	结果 Result
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	1.85	-
创伤弧菌 <i>Vibrio vulnificus</i>	1.38	-
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	1.38	-
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	0.90	-
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.98	-
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	0.88	-
杀鲑气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i>	1.14	-
鲶爱德华氏菌 <i>Edwardsiella ictaluri</i>	0.85	-
AP629	6.28	+

表 1 所示。通过尽可能提高多抗包被量以增加对抗原捕捉能力,参照 ELISA 方法中抗原包被浓度的筛选办法<sup>[11]</sup>,以产生 OD<sub>405</sub> 值接近于 1.0 时的抗原浓度作为最佳包被浓度,确定多抗的包被浓度为 1:400 倍稀释,单抗的最佳稀释度为 1:80。

### 2.2 特异性试验

应用黄海希瓦氏菌 AP629 双抗体夹心 ELISA 检测技术对多种菌株的检测,发现该方法可以特异性检测黄海希瓦氏菌 AP629,与弧菌、气单胞菌、爱德华氏菌、大肠杆菌等均无交叉反应(表 2)。

### 2.3 灵敏度的检测

双抗体夹心 ELISA 检测黄海希瓦氏菌 AP629 敏感性试验结果见表 3。以 PBS 作为菌悬液介质,可检测的最低菌液浓度为  $5 \times 10^4$  cells/mL(检测 1)。应用仿刺参体壁匀浆上清液作为黄海希

瓦氏菌 AP629 的稀释液进行双抗体夹心 ELISA 法灵敏度的检测,其目的是考察该法直接用于发病仿刺参中黄海希瓦氏菌检测的可行性。结果表明以体壁匀浆上清液作为菌悬液介质,可检测的最低菌液浓度为  $5 \times 10^6$  cells/mL(检测 2),置于 28℃ 恒温培养 24 h 后,可检测的最低菌液浓度仍为  $5 \times 10^6$  cells/mL(检测 3)。

### 2.4 仿刺参“化皮”体壁中黄海希瓦氏菌 AP629 的检测

对感染组及对照组仿刺参分别进行双抗体夹心 ELISA 检测(图 1),应用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行统计分析发现,感染组数据显著高于对照组( $P < 0.05$ )。以 10 头对照组仿刺参的检

表3 双抗体夹心 ELISA 敏感性试验结果

Table 3 The result of sensitive test in double-antibody sandwich ELISA.

细菌浓度 (cells/mL) Bacteria concentration (cells/mL)	检测 1 Test 1		检测 2 Test 2		检测 3 Test 3	
	OD <sub>405</sub>	P/N	OD <sub>405</sub>	P/N	OD <sub>405</sub>	P/N
5 × 10 <sup>9</sup>	1.085	8.48	1.137	6.65	1.364	9.03
5 × 10 <sup>8</sup>	1.017	7.95	1.003	5.87	1.107	7.33
5 × 10 <sup>7</sup>	0.974	7.61	0.936	5.47	0.887	5.87
5 × 10 <sup>6</sup>	0.922	7.20	0.633	3.70	0.694	4.60
5 × 10 <sup>5</sup>	0.781	6.10	0.308	1.80	0.217	1.44
5 × 10 <sup>4</sup>	0.617	4.82	0.218	1.27	0.169	1.12
5 × 10 <sup>3</sup>	0.227	1.77	0.189	1.11	0.167	1.11
5 × 10 <sup>2</sup>	0.161	1.26	0.187	1.09	0.163	1.08
5 × 10 <sup>1</sup>	0.143	1.12	0.181	1.06	0.158	1.05
阴性对照 1 Negative control 1	0.128					
阴性对照 2 Negative control 2			0.171		0.151	

注: 阴性对照 1: 以 PBS 替代菌悬液; 阴性对照 2: 以体壁匀浆上清液替代菌悬液。

Note: Negative control 1: PBS instead of bacteria; Negative control 2: Homogenate of body wall instead of bacteria.

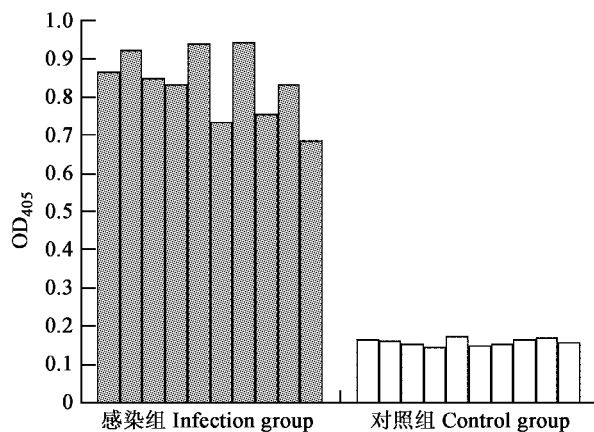


图1 仿刺参体壁中黄海希瓦氏菌 AP629 的检测

Fig. 1 Detection of *S. smarflavi* (AP629) in body wall of *A. japonicus*.

测数据平均值作为对照值, 分别计算 10 头感染组仿刺参的  $P/N$  值, 根据本实验建立的阳性结果判定标准, 发现 10 头感染组仿刺参的检测结果均为阳性。

将表 3 中检测 2 的数据以抗原浓度 10 的幂次方为横坐标 (X), 以  $OD_{405}$  值为纵坐标 (Y) 绘制曲线, 线性回归方程为  $Y = 0.1364X - 0.1493$ , 相关系数  $R^2 = 0.8784$ , 由于  $R^2 > 0.7$ , 可判定为  $Y$  与  $X$  之间为高度线性相关。感染组 10 头仿刺参的  $OD_{405}$  平均值 (Y) 为 0.8346, 根据建立的回归方程, 可推算出感染组仿刺参体壁匀浆上清液中

细菌含量平均为 10 的 7.213 次方 (X), 也就是说细菌浓度大约为  $10^7$  cells/mL。1 g 化皮体壁组织以 20 mL PBS 匀浆离心后, 共获得上清 2.5 mL, 由此可换算得出每克化皮体壁中细菌含量为  $2.5 \times 10^7$  cells。

### 3 讨论

迄今为止, 国际上对黄海希瓦氏菌的研究报道很少。最早是由 Yoon 等<sup>[12]</sup> 于黄海分离获得, 2006 年, 印度学者 Bharathkumar 等于土壤分离得到该菌, 并获得了该菌的部分 rRNA 序列 (GenBank DQ648610.1)。黄海希瓦氏菌隶属于黄海希瓦氏菌属, 其在分类地位上一直以来颇有争议, 且一些生物学特性尚不明确<sup>[12]</sup>。该菌是仿刺参的一种条件致病菌。就水产养殖动物的疾病而言, 快速、准确的诊断是疾病防治的前提条件。现代免疫学、分子生物学等学科的发展, 为该菌的诊断提供了新的理论和实用手段。本研究利用自行制备的黄海希瓦氏菌多克隆抗体和单克隆抗体, 建立了黄海希瓦氏菌 AP629 的双抗体夹心 ELISA 检测技术, 可直接进行病原的检测, 灵敏度高, 操作步骤相对简单。

经验证, 本实验建立的双抗体夹心 ELISA 方法具有一定的特异性, 仅与黄海希瓦氏菌 AP629 有强烈的阳性反应, 与供试对照菌株均无交叉反

应,但目前由于缺少其他参考株,其特异性还有待于进一步验证。

双抗体夹心法利用包被抗体对抗原的捕获作用,使得抗原(细菌)的吸附量明显增多,从而提高方法的灵敏度。王崇明等<sup>[8]</sup>建立的创伤弧菌双抗体夹心 ELISA 检测技术,其灵敏度达  $10^4$  cells/mL;葛萃萃等<sup>[13]</sup>建立的大肠杆菌双抗体夹心 ELISA 检测技术,其最低检出限为  $10^5$  CFU/mL;钟青萍等<sup>[14]</sup>建立的志贺氏菌双抗体夹心 ELISA 检测技术,其最低检出限为  $10^5$  CFU/mL。本实验所建立的黄海希瓦氏菌双抗体夹心 ELISA 检测技术,以 PBS 作为菌悬液介质,其灵敏度达  $10^4$  cells/mL,具有较高的灵敏度。为了验证所建立的双抗体夹心 ELISA 检测技术是否可直接应用于患病仿刺参中病原菌的检测,而无需进行细菌的分离纯化,本研究以仿刺参体壁匀浆上清液作为菌悬液介质进行了检测,但发现检测灵敏度明显降低,仅为  $10^6$  cells/mL,表明体壁匀浆上清液某些组分干扰了抗原抗体间的结合。对加入黄海希瓦氏菌的体壁匀浆上清液培养 24 h 后,其检测灵敏度仍为  $10^6$  cells/mL,表明延长培养时间对检测无明显作用,因此对于含菌量较低的样品必须通过细菌分离扩大培养后才可进行检测。

用双抗体夹心 ELISA 技术对人工感染黄海希瓦氏菌的仿刺参进行检测,稳定性和重复性良好,其病原检出率为 100%。另外,本研究建立的方法从理论上讲,可对仿刺参化皮体壁处的黄海希瓦氏菌进行定量分析,但由于仿刺参化皮是一个由点及面的过程,菌体在体壁中的分布不均匀,且仿刺参化皮后期参体变软,失去附着能力,最终参体全部溃烂成粘液状而脱落死亡<sup>[15]</sup>,很难准确切取体壁组织。因此,应用本方法直接检测仿刺参化皮体壁中黄海希瓦氏菌时,应在仿刺参化皮早期或中期切取化皮处体壁进行匀浆检测,最好同时进行多点检测,但尚不知自然感染仿刺参化皮体壁处菌的浓度是否达到了本方法检测的灵敏度,还需进一步验证。

综上所述,本研究建立的黄海希瓦氏菌 AP629 双抗体夹心 ELISA 法具有准确、快捷、灵敏和操作简便等特点,为仿刺参及其养殖环境中

黄海希瓦氏菌 AP629 提供了快速准确的检测方法,对养殖户进行仿刺参疾病的有效监控和防治具有重要的理论和实际意义。

#### 参 考 文 献

- [1] 张春云,王印庚,荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报,2006,30(1):118-123.
- [2] 马悦欣,徐高蓉,常亚青,等. 大连地区刺参幼参溃烂病细菌性病原的初步研究[J]. 大连水产学院学报,2006,21(1):13-18.
- [3] 杨嘉龙,周丽,邢婧,等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析[J]. 中国水产科学,2007,14(6):981-988.
- [4] 杨嘉龙,周丽,绳秀珍,等. 养殖刺参溃疡病病原菌 RH2 的鉴定及其生物学特性分析[J]. 水产学报,2007,31(4):504-511.
- [5] 王高学,原居林,赵云奎,等. 刺参表皮溃烂病病原菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(8):87-96.
- [6] Deng H, He C B, Zhou Z C, et al. Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Aquaculture, 2009,287:18-27.
- [7] Li H, Qiao G, Li Q, et al. Biological characteristics and pathogenicity of a highly pathogenic *Shewanella marisflavi* infected sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. J. Fish Dis., 2010,33:865-877.
- [8] 王崇明,杨冰,宋晓玲,等. 应用双抗夹心 ELISA 法检测皱纹盘鲍致病病原—创伤弧菌的研究[J]. 海洋水产研究,1999,20(1):30-36.
- [9] 程顺峰. 牙鲆淋巴囊肿病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 水产科学,2009,28(7):374-377.
- [10] 孙学强,金业,陆承平. ELISA 双抗体夹心法检测河蟹“颤抖病”病毒[J]. 南京农业大学学报,2001,24(4):67-70.
- [11] 焦奎,张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004,93-95.
- [12] Yoon J H, Yeo S H, Kim I G, et al. *Shewanella marisflavi* sp. nov. and *Shewanella aquimarina* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea[J]. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2004, 54: 2347-2352.
- [13] 葛萃萃,钟青萍,张旺,等. 双抗夹心 ELISA 检测食品中大肠杆菌 O157:H7 方法研究[J]. 食品科学,2007,28(1):171-175.
- [14] 钟青萍,葛萃萃,张世伟,等. 检测食品中志贺氏菌的双抗夹心 ELISA 方法的研究[J]. 食品科技,2007,10:199-202.
- [15] 董颖,邓欢,隋锡林,等. 养殖仿刺参溃烂病病因初探[J]. 水产科学,2005,24(3):4-6.