

分子生物学技术在水产养殖动物病原快速检测中的应用

The application of molecular methods to rapid detection of aquatic pathogens

贺 电, 吴后波

(中国科学院 南海海洋研究所, 热带海洋环境动力开放实验室 LED, 广东 广州 510301)

中图分类号: Q7; S94 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096 (2007) 03-0076-06

在动植物病原体的检测中, 方法学历经了生物培养、显微镜观察、生化检测、免疫学到分子生物学几个阶段的变更, 朝着更特异、更快速、更便捷、更安全、集成化、微量化、量化、费用低廉化的方向发展。传统病原检测主要依据致病病原体在介质或细胞中的培养、分析病原体表型或血清型特征, 或采用组织学检测病原体对宿主器官的影响^[1]。这类方法耗时、特异性和灵敏度低, 远远不能满足日常快速检测工作的需要。免疫学方法可以在一定程度上缩短检验时间, 就灵敏度而言, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 要高于免疫荧光、反向免疫凝胶电泳和免疫扩散, 是最常用的免疫学检测病原体方法^[2]。但是许多病原体之间存在交叉反应, 从而使免疫学方法受到很大局限性。近 10 a 来, 分子生物技术的快速发展极大提高了水产养殖病害诊断水平。以核酸为基础的分子诊断技术是基于每一种病原体含有特异性的 DNA 或 RNA 序列, 当体外培养基或培养方法没有建立时, 分子生物学技术可以排除这些中间环节, 直接进入检测的核心, 而且能大大地提高检测的灵敏度。根据研究范围和目的, 分子生物学技术能把病原微生物鉴定到亚种、株。分子诊断技术主要包括聚合酶链式反应 (PCR)、探针杂交、限制性酶切和核苷酸测序等, 探针杂交法和 PCR 法是病害检测中最常用的方法。目前, 分子诊断技术已成功应用于鱼、虾、贝的细菌性、病毒性、寄生性和真菌性病原体的检测和鉴定^[3-5]。

1 PCR 检测技术

PCR 技术自 1985 年问世以来, 以其灵敏、特异

和快速的优点在医学和分子生物等领域得到广泛的应用。PCR 技术现已普遍应用于水产养殖动物病原体检测中。

1.1 常规定性 PCR 检测方法

PCR 扩增产物的有或无可以显示样品是否被特定病原体感染。细菌性肾病 (BKD) 是一种感染鲑鱼, 尤其是大麻哈鱼的慢性传染病, 在世界范围内广泛存在, 其病原菌为鲑鱼肾杆菌 (*Renibacterium salmoninarum*)。57 ku 可溶蛋白 (p57) 是鲑鱼肾杆菌表面的主要蛋白^[6], 在编码 p57 的 DNA 中扩增片段, 已被成功地用来检测淋巴液、卵巢液和鱼卵中的鲑鱼肾杆菌。Brown 等^[7]设计的引物 BKDR 和 BKDF 扩增 p57 蛋白编码基因的 501 bp 片段, 有较强特异性, 是国际兽疫局《水生动物疾病诊断手册》中所推荐使用的分子生物学诊断方法。刘苾等^[8]采用嵌套式 PCR (nested-PCR) 设计引物 BKDR2 和 BKDF2, 扩增 501 bp 扩增产物中 314 bp 的片段, 结果显示灵敏度得到提高, 达 1.8×10^2 个/mL, 而且用冻融煮沸法直接处理得到的裂解液可直接作模板使用, 效果与酚抽提法相当。多重 PCR 系一个反应体系中有对引物, 分别扩增不同片段, 适于同时进行多种病原体的检

收稿日期: 2004-03-02; 修回日期: 2004-06-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371106);

中国科学院知识创新工程资助项目 (KSCX2-1-04)

作者简介: 贺电 (1978-), 女, 湖南长沙人, 硕士, 研究方向为水生生物病害; 吴后波, 通讯作者, 电话: 020-89023162, E-mail: wuhoub@scsio.ac.cn

测。Cerro 等^[9]建立基于 16S rRNA 的多重 PCR (multiplex PCR), 同步检测出鱼病原菌杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*)、嗜冷黄杆菌 (*Flavobacterium psychrophilum*)、鲁氏耶尔森氏菌 (*Yersinia ruckeri*)。PCR 亦广泛用于病毒性病原体的检测。例如, 采用 PCR 研究和检测养殖鱼和虾中多种虾病毒, 如传染性皮下与造血组织坏死病毒 (IHHNV), 传染性胰腺坏死病毒 (IPNV), 斑节对虾的白斑综合症病毒 (WSSV), 黄头病毒 (YHV), 病毒性出血性败血症病毒 (VHSV), 虾肝胰腺细小病毒 (HPV), 脱拉综合症病毒 (TSV) 等^[1, 5, 10-12]。

定性 PCR 检测病原微生物虽然快速, 但以肉眼判断阳性条带敏感性受一定限制, 且 PCR 产物需要用酶切或分子杂交验证。在对野外环境的水样、海产品标本进行检测时, 常常由于菌量少、菌株变异大, 而降低检出率。

1.2 荧光定量 PCR 技术

荧光 PCR 技术是 1995 年由美国 PE 公司首先研制成功的, 它是传统 PCR 技术的突破, 融汇了 PCR 的灵敏性、DNA 杂交的特异性和光谱技术精确定量的优点, 电脑同步跟踪, 数据自动化处理, 直接探测 PCR 过程中的变化以获得定量的结果, 不需要做 PCR 后处理或检测, 完全闭管操作。与一般 PCR 技术相比, 荧光 PCR 检测技术不仅大大提高了样品的分析速度和灵敏度, 简化了操作步骤, 而且可消除扩增产物引起的交叉污染、降低假阳性率。例如, 传统方法难以检测处于存活状态但难以培养的霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*), Lyon 等^[13]从该菌的 *hlyA* 序列中设计引物和探针, 采用荧光定量 PCR 特异检测出牡蛎及环境中的霍乱弧菌 O1, O139, Non-O1, Non-O139 型。张世英等^[14]采用荧光 PCR 技术检测水、海产品及临床病例中的霍乱弧菌, 灵敏度达 1×10^2 CFU/mL, 比同组进行的定性 PCR 方法灵敏度提高了 3 个数量级, 且阳性检出率高。Overturf 等^[15]采用荧光 PCR 检测出鲑鱼中的 IHHNV 病毒。荧光定量 PCR 能对检测的 DNA 进行准确定量, 对患病动物的疗效观察及指导用药具有重大意义。但是, 荧光 PCR 成本较高, 目前在水产养殖动物的常规病原体检测中的应用还不多。

1.3 PCR-ELISA 技术

ELISA 技术作为一种快速、灵敏的诊断体系, 广泛应用于病原体检测中。ELISA 中的特异性抗体多由

单克隆抗体或多克隆抗体制备而成, 但抗体通常难以获得, 而且在检测中较易出现交叉反应, 限制了该技术在病原诊断中的应用^[16]。PCR 技术与 ELISA 的结合 (PCR-ELISA), 极大地提高了病原诊断方法特异性和灵敏性。例如 Laurence 等^[17]获得 *Perkinsus marinus* 和 *P. atlanticus* 的特异性扩增片段, 将扩增产物用 DIG 标记, 与包被在微量滴定板中的特异探针杂交, 杂交产物被 DIG 过氧化物酶标记的抗体结合, 通过过氧化物酶底物显色反应检测出扩增产物的有无及数量。PCR-ELISA 分析比通过凝胶电泳观察 PCR 产物的灵敏度提高 100 倍, 可以检测出 *P. atlanticus* 中 1 pg 的 DNA, 其灵敏性与 Southern 杂交相当, 且无交叉反应, 该方法在蛤中进行了应用, 并在处理大量样品时效果理想。

1.4 PCR 检测技术所面临的问题

PCR 技术在实际应用中需不断验证、优化反应参数, 如引物设计、模板 DNA 的制备、镁离子浓度、退火温度等, 以获得最大灵敏度和特异性。Vaneechoute 等^[18]对 PCR 技术在微生物诊断中的问题进行了详细报道和分析。PCR 的灵敏度在临床和野外试验比在实验室研究中的结果要低, 模板中高浓度宿主 DNA 和大量动物细胞会抑制 PCR 扩增。在许多情况下, 优化 PCR 参数的工作往往是以纯培养物提取的 DNA 或已被克隆的 DNA 为模板, 因此优化的参数应与直接以临床标本为模板的 PCR 参数稍微不同。PCR 反应中极微量的污染便可导致假阳性或假阴性结果, 其中产物污染是最主要因素。PCR 技术对实验环境和操作要求苛刻, 防止 PCR 产物污染, 以避免假阳性和提高 PCR 诊断技术的稳定性已成为亟待解决的问题。

2 核酸杂交检测技术

核酸杂交是常用的分子生物学技术之一, 它是利用变性的 DNA 双链能够在一定条件下以互补配对的原则相互结合复性的原理, 特异地检测目标样品中与探针同源序列的技术。

2.1 核酸探针

核酸探针 (probe) 是指能与特定核酸序列发生特异性互补的已知核酸片段。标记的核酸探针可以用于待测核酸样品中特定基因序列的检测。根据核酸探针的来源及性质可分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针及人工合成的寡聚核苷酸探针。探针

标记物分为放射性标记物和非放射性标记物。放射性同位素标记物是目前应用最多的一类核酸探针标记物,其灵敏度和特异性极高,可检测出样品中少于1000个分子的核酸含量。常用的放射性标记物有 ^{32}P 、H和 ^{35}S 。但放射性标记实验周期长、不稳定、不安全,随着技术改进,非放射性标记探针因其稳定、特异性强、简便、快速和安全等特点逐步代替了放射性标记。这些方法主要是将探针与一些半抗原连接在一起,例如生物素、地高辛(DIG)等,然后用带有荧光、化学发光剂或显色剂的抗体对这些抗原——探针复合物进行检测^[19]。现在,DIG标记的基因探针多方面用于虾病原体诊断中。例如,雷质文等^[20]用PCR法制备的DIG标记的547 bp探针检测WSSV。

2.2 探针杂交技术

核酸探针作为检测特异的核酸序列的标记,广泛应用于Southern杂交、Northern杂交、斑点杂交和原位杂交中。核酸探针的设计、杂交和洗涤条件的选择能够保证探针只能与待测样品基因组中的互补区域杂交而不会与其它序列反应,从而确保探针杂交检测技术的特异性和准确性。

1982年Langer首先采用了生物素标记的探针进行染色体原位杂交,标志着非放射性同位素原位杂交的建立^[21]。原位杂交是用标记的DNA或RNA为探针,在原位检测组织细胞内特定核酸序列的方法。用探针对组织细胞等进行的原位杂交可以对病原体在宿主内的位置进行定位。原位杂交技术在鱼、虾病害快速诊断中应用很广,特别适用于病毒的检测。例如,Gergory等^[22]采用原位杂交检测大西洋鲑鱼内脏中的鲑鱼贫血病毒(ISAV),所用探针S8特异性强,与其他病毒性病原体无杂交。Kathy等^[23]采用DIG标记的YHV基因探针对在澳大利亚感染鳃联合病毒(GAV)的虾进行原位杂交,在虾的淋巴组织、鳃、触角腺及胃上皮细胞中均检测到GAV。这证明YHV探针可作为GAV有效检测工具,并有力说明这两种病毒具有高亲缘关系。为检测WSSV,邓敏等^[24]对濒死对虾匀浆制成的病理切片分别进行原位杂交、Southern杂交和斑点杂交,同时对照健康虾,探针均特异地与病虾片段强杂交,而与健康虾无杂交。斑点杂交是常用的一种快捷基因检测方法,根据杂交膜上点样斑点的有无或强弱推算样品是否染病,还可以半定量病原。此法操作简便,可在一般实验室进行。例如,史成银等^[25]采用核酸斑点杂交分析对虾皮下及造血组织坏死杆

状病毒(HHNBV),在1997年青岛养殖场的发病虾池对虾中,检测结果显示为强烈的HHNBV阳性。目前,中国水产科学院黄海水产研究所病害室已研制出“对虾暴发性流行病原核酸探针-点杂交检测试剂盒”^[26]。探针杂交也常应用于细菌性病原体检测,例如,Cerda-Cuellar等^[27]应用特异性核酸探针VSV3检测鱼肠道中的大菱鲆弧菌(*Vibrio scophthalmi*)。目前,多种虾病毒检测试剂盒已实现商业化,例如,用DIG标记探针检测IHHNV, WSSV检测试剂盒等。探针杂交虽然灵敏可靠,但是其操作较为其他分子检测技术复杂、繁琐,影响了它在常规快速检测中的应用。

3 限制性酶消化技术

3.1 限制性片段长度多态性

限制性内切酶识别DNA中特异短小序列,并在该位点将DNA切断。单个核苷酸序列的变化也会导致某一酶切位点的增加或缺失,改变在DNA消化产生的片段数量,消化的DNA经凝胶电泳分离呈现限制性片段长度多态性(RFLP)。RFLP是检测DNA在限制性内切酶酶切后形成的特定DNA的大小,是最早应用于种属鉴定、分类和多样性研究的分子生物学技术。由于限制性酶作用的对象为该生物的全基因组,因此理论上能够覆盖生物的所有基因^[28,29]。限制性酶切作为一种实验手段,常与其他分子技术结合使用。RFLP能够体现不同种系甚至个体间的细小差异。当鉴别相近亲缘的细菌性或寄生性病原体时,可先PCR扩增特定序列,再对扩增产物进行限制性内切酶酶切分析,即PCR-RFLP。例如,Cunningham等^[30]用PCR扩增三代虫属(*Gyrodactylus*)的三种寄生虫(*Gyrodactylus salaricus*, *Gyrodactylus derjavini*和*Gyrodactylus truttae*)的rRNA基因ITS区域,得到大小相似的片段,扩增子经限制性内切酶Sau3AI消化后,所产生的RFLP带谱能够快速、清晰地鉴别3种寄生虫间的差异。

3.2 随机扩增多态性DNA技术

随机扩增多态性DNA(RAPD)技术是一种研究基因组遗传标记的方法,它采用系列8~10个碱基的随机引物对基因组进行扩增,经凝胶电泳区分不同长度片段的条带,根据条带的有无计算样品之间基因组的差异。同RFLP一样,该方法理论上可以覆盖整个基因组,能够体现多数微小的变异情况。由于该方法应用了PCR技术,无需专门设计引物,操作简单、

方便,但是,RAPD分析稳定性比较差,重复性不高^[28,29,31]。RAPD技术被广泛应用于生物的遗传多样性和流行病学的研究中。例如,Magarinos等^[32]对79个美人鱼发光杆菌杀鱼亚种(*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)株系进行RAPD分析后,发现欧洲来源株系与日本来源的株系有显著的遗传差别,证明两地暴发的病原*P. damsela*是独立起源,而不是横向转移传播的。RAPD方法在寻找种,血清型特异性甚至致病因子相关基因等方面都是十分有效的。例如,Valle等^[33]在鱼巴斯德氏菌病(*Pasteurellosis*)病原体美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的RAPD分析中,发现两个特异片段,经克隆、测序发现与其它DNA序列无显著同源性。基于这两片段建立了PCR和nested-PCR检测该菌,斑点杂交和Southern杂交显示扩增产物具有美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的高度特异性,能直接从受感染的鱼肾、脾、肝组织中检测到该菌。证明利用RAPD结合PCR技术建立病原体的基因诊断方法是行之有效的。

3.3 扩增 AFLP 技术

扩增 AFLP 技术首先由 Zabeau 和 Vos 在 1993 年创立,利用 RFLP 可靠性和 PCR 的高效性,对基因组 DNA 酶切片段进行选择性的扩增。其实质是利用两种或两种以上的酶切割 DNA,形成不同的酶切片段,在所得的酶切片段上加上双链人工接头,作为 PCR 扩增的模板。AFLP 技术有高度特异性,既克服了 RFLP 技术中 Southern 杂交的繁琐和耗时的缺点,又解决了 RAPD 技术中非特异 PCR 扩增而引起的可信度问题。AFLP 技术以其快速、高效、简便和结果稳定可靠的特点,被推广到生物学各个研究领域,如遗传图谱的构建、基因或基因组区域特异性标记的筛选和定位、种及种下阶元的分类鉴定、遗传多样性和系统发生等领域^[34,35]。AFLP 现已应用于水生生物遗传结构及遗传多样性的研究^[36]。例如,Aarts等^[35]在对62个血清型的78株*Salmonella*菌株进行 AFLP 指纹分析时,所有的血清型都具有独特的 AFLP 指纹图,并且 AFLP 指纹技术具有较高的分辨率,AFLP 指纹技术被认定非常适合鱼细菌的诊断与鉴定工作。

4 病原微生物快速诊断新技术的展望

基于软件和硬件设备的发展,诊断技术发生了惊人的变化,到21世纪中期DNA检测技术将全面代替现在以蛋白质为基础的方法。

4.1 核苷酸测序技术

近年来,应基因组测序计划的要求,核苷酸测序技术得到了极大的发展。核苷酸测序诊断结果在分子诊断技术中是最精确的,它所提供样品的信息最充分,可同时揭示突变体或变异种类的详细情况。自动化测序技术可同时测定多个序列,可在同一个样品中进行多种病原体的检测。但是目前,测序方法成本高、消耗时间长,不能满足快速、经济的常规病害检测。新的、快速、经济的测序方法的建立将使病原菌诊断技术出现新的革命,预见测序技术将取代目前诊断中使用的核酸杂交和 RFLP 技术^[3]。

4.2 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片 (DNA chip) 或 DNA 微阵列 (DNA microarray),是将大量基因探针,按特定的排列方式固定在固体载体上,它通过与被检测基因的碱基序列进行固定互补匹配,实现核酸序列的分子识别,是高效的大规模获取相关生物信息的重要手段。与传统核酸印迹杂交技术相比,基因芯片具有高效、快速和大规模平行处理的优点,是在传统生物技术和疾病诊断等方面的创新和飞跃^[37,38]。基因芯片在 DNA 测序和基因表达分析、临床诊断、药物和疫苗研究等领域有极大应用前景。针对病原微生物基因组的特征性片段、染色体 DNA 的多态性、基因变异的位点及特征等,设计和选择合适的核酸探针并制成芯片,通过与样品中提取的核酸 (DNA 或 RNA) 杂交,一步检测就能获得病原微生物种属、亚型、毒力、抗药、致病、同源性、多态型、变异、表达以及感染病原微生物相对数量等相关信息,为疾病的诊断和治疗提供了一个很好的切入点,也为平行研究病原微生物的大量基因组和功能组提供了有利的工具^[39,40]。美国 Affymetrix 公司现已有诊断用基因芯片上市,如 p53 基因突变诊断芯片、艾滋病基因突变诊断芯片和细胞色素 P450 基因突变诊断芯片等^[40]。Troesch 等^[41]将 16S rRNA 和 rpoB 2 种基因高密度 DNA 探针芯片用于分枝杆菌中属的鉴定和利福平抗药性的测定,结果 27 种 70 株不同的分枝杆菌的及 15 株利福平抗药性 rpoB 基因得到了正确鉴定。微阵列技术在国内也有了较大发展。例如,陈君男等^[42]将 DNA 微阵列技术用于 *HLA DRB1* 基因分型的研究,结果准确、灵敏 (*HLA* 复合体人类主要组织相容复合体,是由至少 80 个以上的基因座位组成的基因复合体,其产物成为人类白细胞抗原,*DRB1* 基因是 *HLA* II 类基因中多

态性最复杂的基因之一)。肖俊华等^[43]运用 cDNA 微阵列杂交技术从人睾丸 cDNA 文库中筛选出人蛋白激酶基因 *NYD-SP9* , Southern 印迹杂交发现, 这一基因高表达于睾丸, 而低表达于卵巢, 结果表明, 蛋白激酶基因 *NYD-SP9* 可能在男性生殖细胞分化过程中发挥一定作用。

基于基因组测序技术和生物信息学的极大发展, 使得探针序列在最近几年急剧增加。我们相信有一天, 一块小小的芯片上, 可以集合能够检测所有鱼、虾、贝类重要病害的探针, 经过一次简单的测试就可以准确地获得病原种类, 基因特征, 致病能力等等信息。

分子生物学检测方法已经在水产养殖动物疾病诊断中逐步建立起来, 相信随着试验方法的不断优化和设备的日益更新, 新的技术的发展必将完全改变目前病害诊断与流行病学研究的现状, 并为有效控制病害的发生提供广大前景。

参考文献:

- [1] Adams A, Walker P J, Subasinghe R. Rapid detection and identification of fish pathogens[A]. DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases(395)[C]. 2000, 1-2.
- [2] Meyers T R, Short S, Farrington C, *et al.* Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the fluorescent antibody test (FAT) for measuring the prevalences and levels of *Renibacterium salmoninarum* in wild and hatchery stocks of salmonid fishers in Alaska, USA[J]. **Diseases of Aquatic Organisms**, 1993, 16: 181-189.
- [3] Cunningham C O. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control[J]. **Aquaculture**, 2002, 206: 19-55.
- [4] Karunasagar I, Sugumar G, Karunasagar I, *et al.* Rapid polymerase chain reaction method for detection of Kanagawa positive *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods[J]. **Food Microbiology**, 1996, 31: 317-323.
- [5] Lightner D V, Redman R M. Shrimp diseases and current diagnostic methods[J]. **Aquaculture**, 1998, 164: 201-220.
- [6] Chien M S, Gilbert T L, Huang C, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the gene coding for the 57-kDa major soluble antigen of the salmonid fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1992, 96: 259-266.
- [7] Brown L L, Iwana G K, Evelyn T P T, *et al.* Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within individual salmonid eggs[J]. **Disease of Aquatic Organisms**, 1994, 18: 165-171.
- [8] 刘荻, 高隆英, 史秀杰, 等. 用 nested-PCR 方法快速检测鲑鱼肾杆菌[J]. 水产学报, 2002, 26(5): 453-458.
- [9] del Cerro A, Marquez I, Guijarro J A. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, 68(10): 5177-5180.
- [10] Barnes A C, Davidson G A, Hiney M P, *et al.* Methodology in Fish Diseases Research[M]. Aberdeen: 1998. 203-209.
- [11] Saint-Jean S R, Borrego J J, Perez-Prieto S I. Comparative evaluation of five serological methods and RT-PCR assay for the detection of IPNV in fish[J]. **Journal of Virological Methods**, 2001, 97: 23-31.
- [12] Miller T A, Rapp J, Wastlhuber U, *et al.* Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells[J]. **Dis Aquat Org**, 1998, 34: 13-20.
- [13] Lyon W J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67: 4685-4693.
- [14] 张世英, 洪帮兴, 司徒潮满, 等. 荧光定量 PCR 技术在霍乱弧菌检测种的应用[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(3): 345-346.
- [15] Overturf K, LaPatra S, Powell M. Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids[J]. **Journal of Fish Diseases**, 2001, 24: 325-333.
- [16] Alexandra A. Immunodiagnosics in aquaculture[J]. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, 2004, 24(1): 33-37.
- [17] Laurence M E, Ricardo M L, Ricardo A, *et al.* Development of a PCR-ELISA assay for diagnosis of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus atlanticus* infections in bivalve mollusks[J].

- Molecular and Cellular Probes**, 2004, 18: 89-96.
- [18] Vaneechoute V E. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology[J]. **J Med Microbiol**, 1997, 46: 188-194.
- [19] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 30-31, 128-133.
- [20] 雷质文, 史成银, 黄健, 等. PCR 法制备地高辛标记探针斑点杂交检测白斑综合症病毒 (WSSV) [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31 (2): 201-204.
- [21] Lightner D V, Redman R M. Shrimp diseases and current diagnostic methods[J]. **Aquaculture**, 1998, 164: 201-220.
- [22] Gregory A. Detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) by in situ hybridization[J]. **Dis Aquat Org**, 2002, 50(2): 105-110.
- [23] Kathy F- J T, Kirsten M S, Leigh O, *et al*. In situ detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe[J]. **Aquaculture**, 2002, 205: 1-5.
- [24] 邓敏, 何建国, 吕玲, 等. 斑节对虾白斑综合症病毒部分基因组文库及核酸探针检测法[J]. 水产科学, 2000, 24(2): 161-166.
- [25] 史成银, 宋晓玲, 黄捷, 等. 核酸斑点杂交分析法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒 (HHNBV) [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30 (5): 486-489.
- [26] 孙修勤, 黄捷, 刘允坤, 等. 牙鲆淋巴瘤的诊断技术研究[J]. 高技术通讯, 2003, 1: 89-94.
- [27] Cerda-Cuellar M, Blanch A. Detection and identification of *Vibrio scophthalmi* in the intestinal microbiota of fish and evaluation of host specificity[J]. **J Appl Microbiol**, 2002, 93(2): 261-268.
- [28] 王和勇, 陈敏, 廖志华, 等. RFLP、RAPD、AFLP 分子标记及其在植物生物技术中的应用[J]. 生物学杂志, 1999, 16 (4): 19, 24-25.
- [29] 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. 生物技术通报, 1999, 4: 19-22.
- [30] Cunningham C O, McGillivray D M, MacKenzie K, *et al*. Discrimination between *Gyrodactylus salaris*, *G. derjavini* and *G. truttae* (Platyhelminthes: Monogenea) using restriction fragment length polymorphisms and an oligonucleotide probe within the small subunit ribosomal RNA gene[J]. **Parasitology**, 1995, 111: 87-94.
- [31] 吴少慧, 张成刚, 张忠泽. RAPD 技术在微生物生物多样性鉴定中的应用[J]. 微生物学杂志, 2000, 20 (2): 44-47.
- [32] Magarinos B, Toranzo A E, Barja J L. Existence of two geographically -linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen[J]. **J Bacteriol**. 2000, 201: 6 384-6 388.
- [33] Valle L D, Zanella L, Belvedere P, *et al*. Use of random amplification to develop a PCR detection method for causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (Vibrionaceae)[J]. **Aquaculture**, 2002, 207: 187-202.
- [34] 朱伟铨, 王义权. AFLP 分子标记技术及其在动物学研究中的应用[J]. 动物学杂志, 2003, 38 (2): 101-106.
- [35] 吕振岳, 周大民, 黄东东. AFLP 标记及在微生物和动物中的应用[J]. 生物技术通报, 2001, 6: 18-22.
- [36] Waycott M, Barnes P A G. AFLP diversity within and between populations of the Caribbean seagrass *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae)[J]. **Marine Biology**, 2001, 139: 1 021-1 028.
- [37] 张林杰. 微阵列技术及其应用[J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23 (1): 46-48.
- [38] 陈执中. DNA 微阵列技术的研究应用进展[J]. 药物生物技术, 2001, 8 (6): 357-360.
- [39] 赵雨杰, 孙啸, 何农跃, 等. 基因芯片在医学中的应用[J]. 临床检验杂志, 2000, 18 (6): 373-375.
- [40] 易霞, 尚永丰. 生物芯片技术发展及其应用前景[J]. 中国医院, 2003, 7 (7): 51-55.
- [41] Troesch A, Nguyen H, Miyada C G, *et al*. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays[J]. **J Clinical Microbiology**, 1999, 37: 49-55.
- [42] 陈俊男, 李瑶, 李亚莉, 等. 寡核苷酸 DNA Microarray 用于 *HLOA DRBI* 基因分型的研究[J]. 遗传学报, 2001, 28 (10): 887-894.
- [43] 肖俊华, 伊岚岚, 李健民, 等. 利用 cDNA 微阵列技术筛选和鉴定 *NYD-SP9* 基因[J]. 科学通报, 2002, 47 (4): 293-297.

(本文编辑: 刘珊珊)