

致病性维罗纳气单胞菌检测方法的建立

潘晓艺* 蔺凌云 袁雪梅 尹文林 郝贵杰 徐洋 姚嘉赞 沈锦玉*

(浙江省淡水水产研究所 浙江 湖州 313001)

摘要: 发掘维罗纳气单胞菌特异性更强的检测靶点和毒力相关基因靶点, 建立能够检测致病性维罗纳气单胞菌的 PCR 检测方法。通过序列比对分析气单胞菌的 16S rRNA 基因序列, 筛选对维罗纳气单胞菌特异的引物, 用于检测种特异性, 利用气单胞菌气溶素基因保守引物, 检测菌株的致病性, 并进行反应条件和反应体系的优化, 灵敏度试验和特异性试验。发掘并设计的维罗纳气单胞菌 16S rRNA 特异性引物结合气单胞菌气溶素基因保守引物建立的检测方法, 对 12 株气单胞菌和 10 株非气单胞菌的检测结果显示, 所有致病性维罗纳气单胞菌都能扩增到大小分别为 343 bp 和 232 bp 的特异性条带, 而非维罗纳气单胞菌的致病性气单胞菌只能扩增到 232 bp 的气溶素基因特异性条带, 其它菌株都不能扩增到目的条带。灵敏度试验表明, 该反应体系的检测灵敏度为 1.35×10^{-3} mg/L。我们建立的致病性维罗纳气单胞菌检测方法能特异地检测致病性维罗纳气单胞菌, 并具有高度灵敏性。

关键词: 维罗纳气单胞菌, 16S rRNA, 气溶素, 致病性, 双重 PCR

Development of a PCR method for the detection of pathogenic *Aeromonas veronii*

PAN Xiao-Yi* LIN Ling-Yun YUAN Xue-Mei YIN Wen-Lin HAO Gui-Jie
XU Yang YAO Jia-Yun SHEN Jin-Yu*

(Key Laboratory of Fish Health and Immunology, Chinese Academy of Fishery Science, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, Zhejiang 313001, China)

Abstract: The aim of the study was explore a set of new detective targets in pathogenic *Aeromonas veronii* which was more specific than others at present, to develop a new duplex PCR method which could effectively detection the pathogenic *A. veronii*. Comparison analysis of the 16S rRNA gene sequences of *Aeromonas* spp. was used to explore *A. veronii* specific targets, which were then evaluated and used to design specific primers, and select the conservative primers of aerolysin genes in *Aeromonas* spp. to explore pathogenic targets. PCR parameters were optimized, its reaction system was devel-

oped, and its sensitivity and specificity were checked. 12 *Aeromonas* stains and 10 non-*Aeromonas* stains were tested for pathogenic *A. veronii* by duplex PCR method. The duplex PCR can clearly identify *A. veronii* from *Aeromonas* species, and can identify aerolysin-producing stains of *A. veronii*. The detection limit of genomic DNA by the duplex PCR was 1.35×10^{-3} mg/L. A novel duplex PCR method was successfully developed in this study, which could effectively detect pathogenic *A. veronii* with high accuracy and sensitivity.

Keywords: *Aeromonas veronii*, 16S rRNA, Aerolysin, Pathogenicity, Duplex PCR

气单胞菌(*Aeromonas* sp.)是一类革兰氏阴性的杆状细菌, 归属于气单胞菌科(*Aeromonadaceae*), 普遍存在于淡水、海水、淤泥和污水等环境中, 世界各地均有分布, 是人类和动物的重要致病菌, 其中嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌及温和气单胞菌是多种水产动物的病原菌, 常给养殖生产带来较大经济损失^[1-2]。已报道的气单胞菌属包括 24 个种^[3], 其中维罗纳气单胞菌(*Aeromonas veronii*)是 1987 年发现和鉴定, 并于 1988 年正式命名的一个气单胞菌新种^[4]。由于具有致病潜能的气单胞菌经常能够在牛奶^[5]、自来水^[6]和食物^[7]中被发现, 因此对气单胞菌的检测鉴定具有重要的意义。目前气单胞菌的部分种已经有较多的检测方法, 但是对于致病性的维罗纳气单胞菌的 PCR 检测方法还未有相关的研究报道。

传统的气单胞菌的分离鉴定主要采用体外培养的方法, 但是这种方法费时费力, 且不能判断致病菌和非致病菌, 而目前免疫与分子检测方法已成为鉴定气单胞菌的主要手段。气单胞菌分子检测的方法主要包括酶联免疫吸附试验(ELISA)^[8]、免疫荧光技术^[9]、常规 PCR 检测^[10]、多重 PCR 检测^[11]、荧光定量 PCR 检测^[12]等。免疫学技术和荧光定量 PCR 尽管检测灵敏度高, 但是由于操作复杂和相对昂贵, 实际中较少应用。多重 PCR 可以同时多个目的基因片段进行扩增, 提高了鉴定结果的准确性, 经常被用于病原菌的检测。

嗜水气单胞菌多重 PCR 鉴定方法国内外已经有多篇报道^[13-14], 主要采用 16S rRNA 和外毒素基因作为目的序列。Martinez-Murcia 等使用 16S rRNA 序列对气单胞菌和邻单胞菌(*Plesiomonas* sp.)进行聚类分析后认为 16S rRNA 序列可以用于大多数气

单胞菌的鉴定, 而基于 16S rRNA 的气单胞菌 RFLP-PCR 分析证实维罗纳气单胞菌的 16S rRNA 与其近缘种存在较大的变异, 预示着该序列能够用于维罗纳气单胞菌的特异性鉴定^[15]。气单胞菌的外毒素已经发现包括有气溶素(Aerolysin)、溶血素(Hemolysin)、溶血毒素(Hemolytic toxin)和细胞毒性肠毒素(Cytolytenterotoxin)等, 这些毒素在基因结构和功能上具有一定的相似性^[16]。其中气溶素是气单胞菌重要的毒素, 激活后的气溶素能够结合并破坏宿主细胞的细胞膜, 导致细胞死亡。目前, 气溶素基因已经成为气单胞菌一个稳定的分子标记用于检测潜在的致病菌株^[16]。

本研究以维罗纳气单胞菌为材料, 通过设计 16S rRNA 和气溶素基因的引物, 采用双重 PCR 的方法, 特异性的鉴定具有潜在致病性的维罗纳气单胞菌, 为深入研究维罗纳气单胞菌的致病机理和病害防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本研究所用菌株中, 气单胞菌参考菌株 8 株, 本实验室临床分离株 4 株, 非气单胞菌 10 株, 具体情况如表 1。非标准菌株为本实验室分离所得, 参考菌株购买自美国标准生物制品收藏中心(ATCC)。

1.2 工具酶和试剂

Taq 酶和 dNTP 购自北京天恩泽基因科技有限公司, TSB 培养基购自杭州天和微生物试剂有限公司, 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒为爱思进生物技术(杭州)有限公司产品, 引物合成和产物测序委托南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

表 1 研究用菌株列表
Table 1 Strains used in this study

菌株 Strains	来源 Resources	菌株 Strains	来源 Resources
<i>A. veronii</i> MRM0908	The authors	<i>A. caviae</i> MRB0811	The authors
<i>A. veronii</i> TS2M	The authors	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	ATCC
<i>A. veronii</i> NW081006	The authors	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	ATCC
<i>A. sobria</i> ATCC43979	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	ATCC
<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	ATCC	<i>Enterobacter cloacae</i> 216L	The authors
<i>A. caviae</i> ATCC15468	ATCC	<i>Streptococcus agalactiae</i> HNLFYL4	The authors
<i>A. bestiarum</i> ATCC51108	ATCC	<i>Vibrio harveyi</i> 1108-1	The authors
<i>A. allosaccharophila</i> ATCC51208	ATCC	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC33847	ATCC
<i>A. media</i> ATCC33907	ATCC	<i>V. alginolyticus</i> ATCC17749	ATCC
<i>A. eucrenophila</i> ATCC23309	ATCC	<i>V. vulnificus</i> M100311	The authors
<i>A. ichthiosmia</i> ATCC49904	ATCC	<i>V. fluvialis</i> M10037	The authors

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

所有细菌分别划线接种于 TSA 培养基, 28 °C 培养 16 h 后, 挑取单克隆菌落接种 TSB 中振荡培养 16 h。吸取 100 μL 菌液参照文献[17]进行细菌基因组 DNA 的提取, 现提用; 用于灵敏性检测的基因组 DNA 采用细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒提取, 并检测 DNA 浓度^[18], 保存-40 °C 备用。

1.4 引物设计

16S rRNA 基因结构既具保守区又具高变区, 保守性反映生物物种的亲缘关系, 高变区则揭示生物物种的特征核酸序列, 是属种鉴定的分子基础, 因

此, 可利用可变区的差异鉴别菌种。首先根据伯杰氏系统细菌学手册^[19]中所列的气单胞菌所有 17 个种和 10 个亚种, 见表 2。选取其中各个种的参考菌株, 并对所有选取的参考菌株的 16S rRNA 基因序列通过 ClustalX2 进行比对, 寻找关联区域, 选取对维罗纳气单胞菌特异的序列区, 采用 Primer Premier 5.0 设计引物并计算理论退火温度, 并对设计的引物通过 BLASTn 与其它气单胞菌属的基因以及其它菌种的基因进行比对, 验证该对引物的种特异性。毒力基因气溶素基因引物参照文献[20], 为 AHCF1 (5'-GAGAAGGTGACCACCAAGAACA-3')和 AHCR1

表 2 引物设计参考菌株
Table 2 Reference strains used for primers design

种名 Species	菌株 Stains	登录号 GenBank No.	种名 Species	菌株 Stains	登录号 GenBank No.
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 49140	AY987754	<i>A. popoffii</i>	LMG 17541	AJ224308
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	ATCC 7966	X60404	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ATCC 33658	X74681
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i>	ATCC 15467	X60409	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	ATCC33659	AB027543
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	LMG 19562	AJ508765	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	ATCC 27013	X74680
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>	LMG 19707	AJ508766	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	DSM 12609	NR_025001
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199	S39232	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	CCM 4103	AJ009859
<i>A. bestiarum</i>	CIP 7430	X60406	<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700	X74682
<i>A. caviae</i>	ATCC 15468	X74674	<i>A. sobria</i>	ATCC 43979	X74683
<i>A. culicicola</i>	MTCC 3249	AF170914	<i>A. simiae</i>	IBS S6874	AJ536821
<i>A. encheleia</i>	ATCC51929	AJ224309	<i>A. trota</i>	ATCC 49657	X60415
<i>A. enteropelogenes</i>	ATCC 49803	X71121	<i>A. veronii</i>	ATCC 35624	X74684
<i>A. eucrenophila</i>	ATCC 23309	X74675	<i>A. veronii</i>	Pw16	FJ940827
<i>A. ichthiosmia</i>	ATCC 49904	X71120	<i>A. veronii</i>	CC105	FJ940813
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568	X74678	<i>A. veronii</i>	IB340	EU770276
<i>A. media</i>	ATCC 33907	X74679	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	ATCC 35624	X60414

(5'-AACTGACATCGGCCTTGAATC-3'), 预期扩增目的片段大小为 232 bp。

1.5 双重 PCR 反应条件优化

采用 Primer Premier 5.0 对各引物计算的 T_m 值, Av16S-up 和 Av16S-dn 都为 55.8 °C, AHCF1-up 为 59.0 °C, AHCR1-dn 为 60.8 °C。根据《分子克隆实验指南》中推荐的 PCR 反应引物浓度和两对引物的 T_m 值进行两对引物最终的双重 PCR 反应浓度的设计; 并通过温度梯度 PCR 优化双重 PCR 退火温度, 温度设置范围包含两对引物的 T_m 值区域, 梯度温度根据梯度 PCR 仪器自动生成, 选取自动生成在 58 °C–68 °C 之间的 58.2 °C、58.9 °C、60 °C、61.2 °C、62.4 °C、63.6 °C、64.8 °C、66 °C、67.8 °C 10 个温度。双重 PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 10 \times PCR-Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L、dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L) 0.5 μ L、Taq DNA 聚合酶 1 U、Av16S 引物组上下游引物终浓度各为 0.12 μ mol/L、AHCF1-up/AHCR1-dn 引物组上下游引物终浓度各为 0.06 μ mol/L, 基因组 DNA 模板 1 μ L, 最后用灭菌蒸馏水补足至 25 μ L。PCR 反应程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 退火 30 s, 72 °C 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。反应结束用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.6 灵敏性检测

将维罗纳气单胞菌 MRM0908 基因组 DNA 分别稀释为 1.35×10^1 、 1.35×10^0 、 1.35×10^{-1} 、 1.35×10^{-2} 、 1.35×10^{-3} 、 1.35×10^{-4} 、 1.35×10^{-5} 、 1.35×10^{-6} 、 1.35×10^{-7} mg/L, 按 1.4 优化后的 PCR 反应条件和反应体系进行扩增。根据所能检测到的最大稀释度, 确定双重 PCR 的灵敏性。

1.7 双重 PCR 特异性

提取表 1 中所列菌株的基因组 DNA, 进行双重 PCR 特异性试验, 反应体系如 1.4, 退火温度为 1.4 优化后的退火温度。

2 结果

2.1 引物设计

通过 ClustalX 2 对表 1 中所列种的 16S rRNA 序列比对, 选取对维罗纳气单胞菌保守的区段, 从中

选取 3' 端对维罗纳气单胞菌特异的序列作为引物设计的基准序列, 通过 Primer Premier 5.0 计算并优化引物长度和上下游引物的 T_m 值, 使得上下游引物 T_m 值接近或是一致, 设计的上下游引物分别为 Av16S343F (5'-GGGATAACTACTGGAAACGGTA-3') 和 Av16S343R (5'-GTAACGTCACAGCTGGCAGT-3'), 预期扩增目的片段长度为 343 bp。通过 ClustalX 2 软件比对, 发现设计的上游引物 Av16S343F 除了与维罗纳气单胞菌特异外, 还与以下 4 个种特异: *A. culicicola* MTCC 3249、小鱼气单胞菌(*A. ichthiosmia* ATCC49904)、简达气单胞菌(*A. jandaei* ATCC 49568)、舒伯特气单胞菌(*A. schubertii* ATCC 43700); 下游引物 Av16S343R 除了对维罗纳气单胞菌特异外, 还与以下 4 个种特异: 异常嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila* CECT 4199)、小鱼气单胞菌(*A. ichthiosmia* ATCC49904)、猴气单胞菌(*A. simiae* IBS S6874)。上下游引物交叉特异性中除了小鱼气单胞菌(*A. ichthiosmia* ATCC49904)外, 都为维罗纳气单胞菌。说明小鱼气单胞菌(*A. ichthiosmia* ATCC49904)与维罗纳气单胞菌在 16S rRNA 上进化比较接近, 这与 Collins MD 等的研究结果一致, 其研究证实小鱼气单胞菌与维罗纳气单胞菌可能为同一个种^[21]。

2.2 双重 PCR 反应条件优化

根据理论计算的引物 T_m 值, 发现气溶素基因引物 AHCF1/AHCR1 的 T_m 值高于 Av16S343F/Av16S343R, 由于在相同退火温度下, 引物与模板的结合效率与 T_m 值相关, T_m 值越高, 结合效率也越高。因此在双重 PCR 反应体系中 2 对引物的终浓度分别设置为 Av16S 引物组为 0.12 μ mol/L、AHCF1-up/AHCR1-dn 引物组为 0.06 μ mol/L。并通过温度梯度 PCR 对双重 PCR 的退火温度进行了优化, 优化结果见图 1。由图/可知退火温度 62.4 °C 和 63.6 °C 时为好, 确定最佳退火温度为 63.0 °C。

2.3 灵敏度检测

采取优化后的双重 PCR 反应体系和反应条件, 检测不同稀释度的维罗纳气单胞菌 MRM0908 基因组 DNA, 结果如图 2。由图 2 可知, 致病性维罗纳气单胞菌基因组 DNA 最低检测量为 1.35×10^{-3} mg/L。

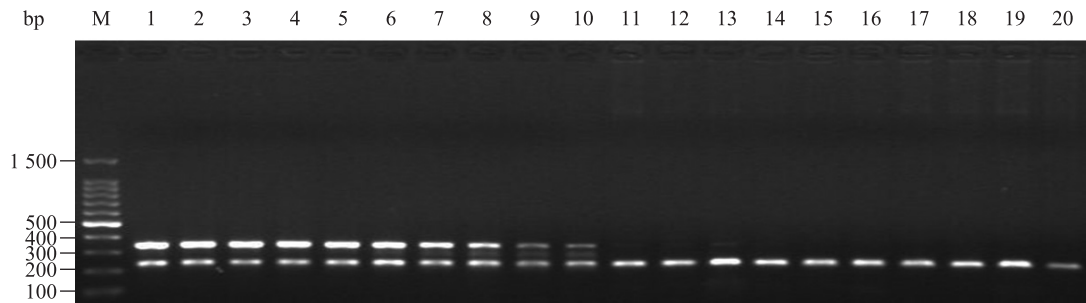


图1 梯度 PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig. 1 Agarose electrophoresis of gradient PCR products

M: 100 bp DNA marker; 1-10: MRM0908; 11-20: ATCC7966.

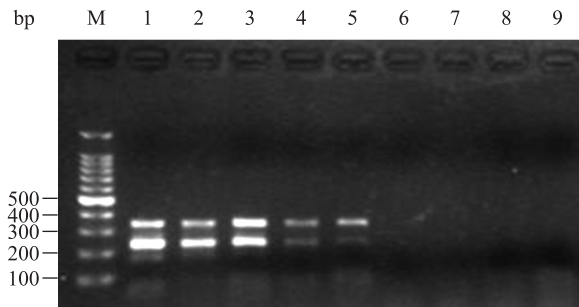


图2 灵敏度分析结果

Fig. 2 Duplex PCR analysis of sensitivity

M: 100 bp DNA marker; 1-9: 1.35×10^1 , 1.35×10^0 , 1.35×10^{-1} , 1.35×10^{-2} , 1.35×10^{-3} , 1.35×10^{-4} , 1.35×10^{-5} , 1.35×10^{-6} , 1.35×10^{-7} mg/L DNA of MRM0908.

2.4 特异性检测

对表 1 中所列的全部菌株进行双重 PCR 检测, 结果见图 3, 仅有维罗纳气单胞菌和小鱼气单胞菌 (*A. ichthiosmia* ATCC49904) 出现 2 个目的带, 而小

鱼气单胞菌已被重新归为维罗纳气单胞菌^[21]。其它致病性气单胞菌的气溶素基因都为阳性, 除以上两种情况外都无目的带。结果表明该双重 PCR 方法对致病性维罗纳气单胞菌特异, 与其它菌种无交叉阳性结果。

3 讨论

维罗纳气单胞菌不仅对水产养殖业造成了重大损失, 同时它也是人类的重要病原菌。研究发现, 维罗纳气单胞菌、嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌占据了 85% 的气单胞菌引起的人类疾病^[22], 因此对维罗纳气单胞菌尤其是具有致病潜能的维罗纳气单胞菌的检测和研究具有重要意义。由于传统的细菌分离鉴定方法费时费力, 且需对分离的菌株做毒力试验操作复杂, 此外血清学、免疫学和生物学等检测方

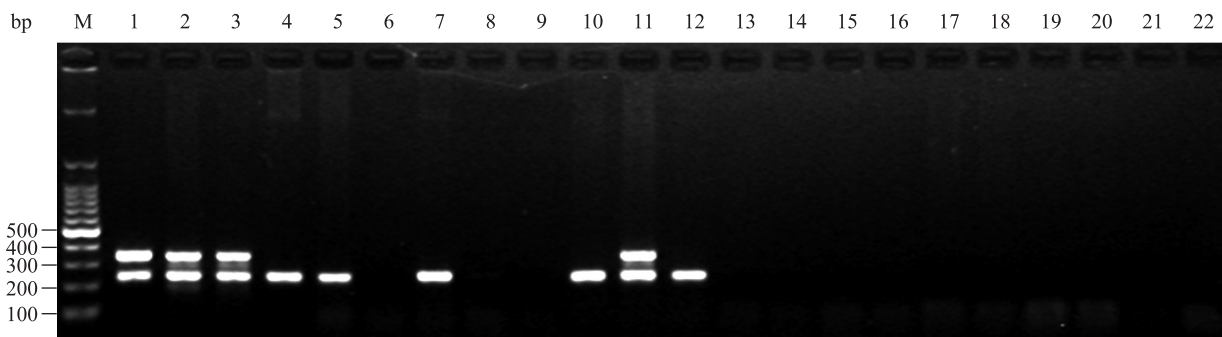


图3 双重 PCR 特异性分析

Fig. 3 Duplex PCR analysis of specificity

M: 100 bp DNA marker; 1: *A. veronii* MRM0908; 2: *A. veronii* TS2M; 3: *A. veronii* NW081006; 4: *A. sobria* ATCC43979; 5: *A. hydrophila* ATCC7966; 6: *A. caviae* ATCC15468; 7: *A. bestiarum* ATCC51108; 8: *A. allosaccharophila* ATCC51208; 9: *A. media* ATCC33907; 10: *A. eucrenophila* ATCC23309; 11: *A. ichthiosmia* ATCC49904; 12: *A. caviae* MRB0811; 13: *E. coli* ATCC25922; 14: *P. aeruginosa* ATCC27853; 15: *S. aureus* ATCC25923; 16: *Enterobacter cloacae* 216L; 17: *S. agalactiae* HNFLFY4; 18: *V. harveyi* 1108-1; 19: *V. parahaemolyticus* ATCC33847; 20: *V. alginolyticus* ATCC17749; 21: *V. vulnificus* M100311; 22: *V. fluvialis* M10037.

法同样存在操作上的复杂性,因此都不适合作为大规模检测和流行病学调查的手段。

16S rRNA 序列作为原核生物共有保守的序列,已经被广泛用于细菌的分类鉴定。rDNA 序列在结构上存在相对保守和非保守性区域,前者反映了物种进化的亲缘关系,后者则给物种的分类鉴定以及新种的发现提供了基础^[23]。目前,依赖 rDNA 序列进行物种鉴定的方法已在细菌和真菌中得到了广泛应用^[24-25]。在气单胞菌中,16S rRNA 序列也已被证实能够获得良好的分类效果^[26]。气溶素是气单胞菌重要的外毒素,其编码基因 *Aer* 已经在多种具有致病性的气单胞菌中被发现^[27]。尽管除了 *Aer* 之外,气单胞菌中还发现了其他的一些基因参与致病过程,但是更多的研究表明,气溶素和溶血素在部分气单胞菌中(如维罗纳气单胞菌和豚鼠气单胞菌)能够直接代表病菌的毒力^[28]。因此对气溶素基因的 PCR 检测能够方便快捷地判断目的菌的致病潜能。

本研究在 16S rRNA 和 *Aer* 基因的基础上,建立了致病性维罗纳气单胞菌的双重 PCR 快速检测方法,对两个基因同时检测,提高了检测的灵敏度,同时能够直接判断目的菌株是否具有潜在的致病潜能。通过比较气单胞菌属中所有种的 16S rRNA 序列,设计对维罗纳气单胞菌特异的引物,通过建立的双重 PCR 进行特异性试验,扩增结果显示,仅有维罗纳气单胞菌和小鱼气单胞菌 ATCC49904 在对应的 16S rRNA 目的带表现出阳性。根据 *Aer* 基因保守区域设计的引物^[19],检测结果显示,豚鼠气单胞菌(*A. caviae*) ATCC15468、异嗜糖气单胞菌(*A. allosaccharophila*) ATCC51208 和中间气单胞菌(*A. media*) ATCC33907 以及其他对照菌株都呈现阴性,说明该双重 PCR 能够良好的检测具有致病潜能的维罗纳气单胞菌菌株,同时也能检测致病性气单胞菌。在特异性试验中,应用该双重 PCR 体系对小鱼气单胞菌 ATCC49904 检测出阳性结果,这与 Collins MD 等的研究结果一致^[21],小鱼气单胞菌 ATCC49904 被重新归为维罗纳气单胞菌。此外,通过梯度 PCR 的方法对双重 PCR 体系进行了优化,结果表明该混合引物在 58 °C-68 °C 退火中都能得到

较好的扩增效果,其中 63 °C 为最优退火温度。该双重 PCR 检测体系的建立,简化和方便了对致病性维罗纳气单胞菌的检测,同时为病害的检疫和大规模流行病学调查奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Jagmann N, Brachvogel HP, Philipp B. Parasitic growth of *Pseudomonas aeruginosa* in co-culture with the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila*[J]. *Environ Microbiol*, 2010, 12(6): 1787-1802.
- [2] Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions[J]. *Clin Infect Dis*, 1998, 27(2): 332-344.
- [3] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(1): 35-73.
- [4] Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, et al. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea[J]. *J Clin Microbiol*, 1987, 25(5): 900-906.
- [5] Porteen K, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN. PCR-based detection of *Aeromonas* from milk samples[J]. *J Food Tech*, 2006, 4(2): 111-115.
- [6] Singh V, Rathore G, Kapoor D, et al. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water[J]. *Indian J Microbiol*, 2008, 48(4): 453-458.
- [7] Balakrishna K, Murali HS, Batra HV. Detection of toxic strains of *Aeromonas* species in foods by a multiplex PCR assay[J]. *Indian J Microbiol*, 2010, 50(2): 139-144.
- [8] Kozaki S, Kurokawa A, Asao T, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Aeromonas hydrophila* hemolysins[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1987, 41(2): 147-151.
- [9] 陈昌福. 用直接荧光抗体法和细菌培养法对中华鳖体内的嗜水气单胞菌的检测[J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(3): 264-266.
- [10] Xia C, Ma ZH, Rahman MH, et al. PCR cloning and identification of the β -haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China[J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1/4): 45-53.
- [11] 潘晓艺, 沈锦玉, 郝贵杰, 等. 气单胞菌和嗜水气单胞菌双重 PCR 检测方法的建立[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(6): 759-763
- [12] 高建忠, 魏雪, 童琰, 等. MGB 探针实时定量 PCR 检测

- 致病性嗜水气单胞菌[J]. 安徽农业科学, 2009, 35(19): 8911-8913.
- [13] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.
- [14] Nam IY, Joh K. Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR[J]. J Microbiol, 2007, 45(4): 297-304.
- [15] Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations[J]. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42(3): 412-421.
- [16] Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, et al. *Aeromonas*-associated infections in developing countries[J]. J Infect Dev Ctries, 2008, 2(2): 81-98.
- [17] 潘晓艺, 沈锦玉, 李建应, 等. 青虾“软壳综合症”病原及其特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1571-1576.
- [18] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. (第三版)上册. 北京: 高等教育出版社, 2002: 507.
- [19] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd ed. Vol. 2 part C. New York: Springer, 2005: 112-113.
- [20] Kingombe CIB, Huys G, Tonolla M, et al. PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp.[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(12): 5293-5302.
- [21] Collins MD, Martinez-murcia AJ, Cai J. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis[J]. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43(4): 855-856.
- [22] Castro-escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Giono CS, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? [J]. Enf Infec Y Micro, 2002, 22(4): 206-216.
- [23] Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA[J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12(14): 5837-5852.
- [24] Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory[J]. Mol Diagn, 2001, 6(4): 313-321.
- [25] Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6): 1353-1360.
- [26] Dorsch M, Ashbolt NJ, Cox PT, et al. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates[J]. J Appl Bacteriol, 1994, 77(6): 722-726.
- [27] Ørmen Ø, Regue MQ, Tomás JM, et al. Studies of aerolysin promoters from different *Aeromonas* spp. [J]. Microb Pathog, 2003, 35(5): 189-196.
- [28] Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, et al. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study[J]. Can J Microbiol, 2007, 53(7): 877-887.

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前3个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。