

文章编号: 1000-0615(2002)05-0453-06

用 nested-PCR 方法快速检测鲑鱼肾杆菌

刘 荭, 高隆英, 史秀杰, 江育林
(深圳出入境检验检疫局水生动物病重点实验室, 广东 深圳 518010)

摘要: 描述了用嵌套式聚合酶链式反应 (nested-PCR) 快速检测鲑鱼细菌性肾病病原鲑鱼肾杆菌的方法。以 BKDR 和 BKDF 为引物, 扩增鲑肾杆菌编码 57 kDa 主要可溶性蛋白基因中 501 bp 的 DNA 片段, 再用引物 BKDR2 和 BKDF2 扩增其中长度为 314 bp 的 DNA 片段。用其它 15 种常见鱼类致病菌验证这两组引物的特异性, 结果没有非特异性的 DNA 片段被扩增出来。用酚抽提法和煮沸加冻融的方法获得的细菌裂解产物, PCR 检测的灵敏度均可达到 $1.8 \times 10^3 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 用 Nested-PCR 进一步扩增 PCR 扩增的产物, 检测灵敏度可再提高 100 倍。检测鲑鱼肾杆菌菌悬液与鲟卵的混合物, 结果表明, 该方法能准确、可靠、快速地检测鲑肾杆菌。

关键词: 细菌性肾病; 鲑鱼肾杆菌; 嵌套式聚合酶链式反应; 检测方法
中图分类号: S941.4 文献标识码: A

Detection of *Renibacterium salmoninarum* by nested-PCR

LIU Hong, GAO Long-ying, SHI Xiur jie, JIANG Yu-lin

(The Key Laboratory of Aquatic Animal Disease, Shenzhen Exit entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518010, China)

Abstract To develop a nested-polymerase chain reaction (nested-PCR) for detection of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease, 2 pairs of primers, BKDF and BKDR, BKDR2 and BKDF2, were designed for amplification of 501 bp and 314 bp DNA fragments of the sequence coding the 57 kDa cell surface protein of *R. salmoninarum* respectively. No specific fragments were amplified when other principal fish bacterial pathogens were used as templates in PCR and nested-PCR tests. The sensitivity of PCR was limited to $1.8 \times 10^3 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ when the bacterial DNA was extracted by phenol-chloroform-isopentanol or boiling & freezing-thawing method. The sensitivity of nested-PCR was 100 times higher than that of PCR test. The mixture of bacteria and cod eggs was detected using nested-PCR and the results showed that the nested-PCR was an effective and reliable method for the detection of *R. salmoninarum*.

Key words: bacterial kidney disease; *Renibacterium salmoninarum*; nested-PCR; detecting methods

细菌性肾病 (BKD) 是一种感染鲑鱼, 尤其是大麻哈鱼的严重的慢性传染病。1930 年, 美国首次报道棕鲑、虹鳟和溪鳟中发生 BKD。此后, 在加拿大、智利、英国、法国、德国、冰岛、意大利、西班牙、南斯拉夫等地养殖的 14 种鲑科鱼类都发生了 BKD^[1]。患病鱼逐渐消瘦, 出现其它临床症状, 并失去治疗价值。其病原鲑鱼肾杆菌 (*Renibacterium salmoninarum*), 是革兰氏阳性杆菌中肾杆菌属的唯一一种。该菌苛刻的生长条件和缓慢的生长速度使疾病的诊断十分困难。虽然可以通过形态学、染色反应和免疫学技术进行鉴定, 但花费时间长, 而且灵敏度和特异性都难以满足现场快速检测的需要。国际兽疫局参考实验室认为^[2], 同已有的细菌生化鉴定和免疫学检测方法相比, PCR 能解决大多数有关灵敏度和特异性的

收稿日期: 2001-12-25

资助项目: 国家质量监督检验检疫局资助(K009-2000)

作者简介: 刘 荭(1971-), 女, 安徽阜阳人, 兽医师, 在职博士研究生, 主要从事鱼病学研究。Tel: 0755-25592980, E-mail: wklh@

困难,所以它可能在今后几年内被许多实验室采用。我们在探索了BKD培养方法的基础上,采用两对引物BKDR和BKDF、BKDR2和BKDF2,已经初步建立起用nested PCR技术在进境水生动物和动物产品中,快速、准确检测鲑鱼肾杆菌的方法,并且进行了特异性试验,比较了不同的样品处理方法对灵敏度的影响。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

鲑鱼肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*),由英国Weymouth的OIE参考实验室B. J. Hill博士赠送。接种到肾病血清增菌培养基(简称KDM2, L-半胱氨酸0.1g,胰蛋白胨1g,酵母提取物0.05g,琼脂1.5g,蒸馏水90mL,用NaOH调整pH至6.5~6.8,120℃高压灭菌20min,培养前加入10%胎牛血清和1.5%已培养过鲑鱼肾杆菌的KDM2灭菌肉汤)上,15℃培养。其它15种常见鱼类致病菌菌株由东京大学鱼病学研究室提供,菌株名称及培养方法见表1。

1.2 鱼 卵

取自俄罗斯进口的鲟鱼卵。

1.3 试 剂

Taq DNA聚合酶($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$),Taq酶用10倍缓冲液,25mmol·L⁻¹MgCl₂,脱氧核苷三磷酸混合物(dNTPs),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和矿物油均购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.4 引 物

由上海生工生物工程技术有限公司合成。一对引物为: BKDR: 5'-CAAGGTGAAGGGAATTCTTCCACT-3'; BKDF: 5'-GACGGCAATGTCCGTTCCCGTTT-3'。扩增鲑鱼肾杆菌57kD细胞表面蛋白msal基因中501bp的DNA片段。另一对引物为: BKDR2: 5'-TTCAACAGTACAAGGCTTCA-3';和BKDF2: 5'-CGCATTATCGTTACACCC-3'。从上述501bp的片段中扩增314bp的DNA片段。

1.5 细菌核酸抽提

采用酚抽提法。取400μL细菌悬液,加CTAB(2%CTAB,1.4mol·L⁻¹NaCl,20mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸EDTA,100mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷盐酸溶液Tris-HCl,pH=7.5,用前加0.25%α巯基乙醇)到800μL。摇匀后,25℃作用2h。加700μL酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),用力混合30s,12000r·min⁻¹离心5min,取上层水相;加500μL氯仿/异戊醇(按24:1的比例混合),用力混合30s,12000r·min⁻¹离心5min,取上层水相;加1.5倍体积-20℃预冷的无水乙醇,混匀后-20℃过夜以沉淀核酸;15000r·min⁻¹离心30min,小心弃上清,立即用滤纸洗干(应尽量充分吸干),37℃干燥约20min;加10μL水溶解后,作为PCR模板。

1.6 PCR 扩 增

在500μL PCR管中,加入PCR反应混合物,总体积100μL。含10μL Taq酶用10倍缓冲液、10μL 25mmol·L⁻¹MgCl₂、2μL dNTP(各200mmol·L⁻¹、引物各2.5μL(100pmol)、1μL Taq酶(5单位)和62μL双蒸水,然后加入10μL待测样品DNA作为模板。设立PCR阴性对照,不加模板,用10μL水代替。其余同上所述。最后加50μL矿物油。混匀后稍离心,让矿物油在上层。再将反应管置于PCR扩增仪。先94℃4min一个循环,然后94℃、1min→48℃、1min→72℃、2min30次循环,再72℃10min,最后4℃保温。

表 1 实验中使用的菌株及其培养方法

Tab. 1 Bacterial strains and their culture mediums in this experiment

菌株名称 bacterial strain	菌株编号 No. of strain	培养基 medium	培养温度 temperature °C
鲑鱼肾杆菌 <i>Renibacterium salmoninarum</i>	Rs Plym Lea 223dS	KDM2	15
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	IAM 12460	BHIA	25
杀鲑产气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i>	ATCC 14174	BHIA	25
柱状嗜纤维菌 <i>Cytophaga columnaris</i>	ATCC 43622	TYE	25
爱德华氏菌 <i>Edwardsiella ictaluri</i>	JCM 1680	BHIA	25
迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	ATCC 1594T	BHIA	25
嗜冷屈挠杆菌 <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	FPC832	TYE	18
绿针假单胞菌 <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	IA M12354T	BHIA (0.5% NaCl)	15
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	IAM 12022	BHIA	25
恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	IA M12354T	BHIA	25
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	IAM 1011	BHIA	25
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	IAM 12012	BHIA	25
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	NCIMB829	BHIA (2% NaCl)	25
病海鱼弧菌 <i>Vibrio ordalii</i>	ATCC 33509	BHIA (2% NaCl)	25
海弧菌 <i>Vibrio parvulus</i>	ATCC 25916T	BHIA (2% NaCl)	25
鲁克氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	ATCC 29473	BHIA	25

1.7 nested PCR

在 500 μ L PCR 管中, 加入 PCR 反应混合物, 总体积 100 μ L。含 10 μ L Taq 酶用 10 倍缓冲液、10 μ L 25mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂、2 μ L dNTP (各 200 μ mol \cdot L⁻¹、引物各 2.5 μ L (100 pmol)、1 μ L Taq 酶和 68 μ L 双蒸水, 然后加入 4 μ L 上述 PCR 扩增产物作为模板。设立 PCR 阴性对照, 不加模板, 用 4 μ L 水代替。其余同上所述。最后加 50 μ L 矿物油。混匀离心, 使矿物油在上层。再将反应管置于 PCR 扩增仪。先 94 $^{\circ}$ C、4 min 一个循环, 然后 94 $^{\circ}$ C、1 min \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C、2 min 30 次循环, 再 72 $^{\circ}$ C、10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。

1.8 琼脂糖核酸电泳

用 TBE 缓冲液配制 1.5% 的琼脂糖 (含 0.5 μ g \cdot mL⁻¹ 溴化乙锭 [EB]) 板, 约 0.5 cm 厚。将平板放入水平电泳槽, 使电泳缓冲液刚好淹没胶面。8 μ L 样品加入 2 μ L 样品缓冲液, 混匀后加入样品孔。30 mA 电泳到溴酚兰达底部时停止。在紫外灯下观察核酸带。

1.9 灵敏度测定

取在 KDM2 上培养 6d 的 BKD, 制成菌悬液, 10 倍系列稀释后, 用平板稀释法测细菌浓度。取 400 μ L 进行酚抽提; 各取 10 μ L (3 组), 分别作冻融两次, 煮沸 10 min, 冻融两次加煮沸 10 min 处理, 得到的细菌裂解产物直接作为模板使用。比较用这 4 种方法获得裂解细菌核酸后, 对检测灵敏度的影响。

1.10 特异性测定

取表 1 中所列菌株的新鲜培养物, 按 1.4 所述方法抽提核酸, 作为模板, 按 1.6 所述进行 PCR 扩增, 引物为 BKDR 和 BKDF。以 PCR 产物作为模板, 按 1.7 所述进行 nested PCR 扩增, 引物为 BKDR2 和 BKDF2。

2 结果

2.1 细菌 p57 表面蛋白基因 DNA 片段的扩增

把含有 *R. salmoninarum* 的阳性样品经抽提后作为 PCR 扩增的模板, 用 BKDR 和 BKDF 作 PCR 扩增的引物, 电泳结果显示为 1 条约 501bp 的 DNA 片段; 再将上述 PCR 扩增的产物作为模板, 用 BKDR2 和 BKDF2 为引物, nested PCR 扩增后, 电泳结果显示为长度约 314 bp 的 DNA 片段 (图 1)。

2.2 特异性试验

取15个其它常见鱼类致病菌菌株作为模板,和鲑鱼肾杆菌一起,作PCR和nested-PCR扩增。结果(表2)显示,不能从其它15个常见鱼类致病菌株扩增出501 bp和314 bp的DNA片段。表明这两对引物有一定的特异性。

表2 用BKD两对引物分别对15个常见鱼类致病菌菌株进行PCR检测的结果

Tab. 2 Detection of 15 fish bacterial pathogens with primers of *R. salmoninarum* by PCR and nested PCR

序号 No.	菌株名称 bacterial strain	PCR 检测结果 result of PCR	nested-PCR 检测结果 result of nested PCR
1	鲑鱼肾杆菌 <i>R. salmoninarum</i>	+	+
2	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-
3	杀鲑产气单胞菌 <i>Aeromonas salmonicida</i>	-	-
4	柱状嗜纤维菌 <i>Cytophaga columaris</i>	-	-
5	迟缓爱德华氏菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	-	-
6	爱德华氏菌 <i>Edwardsiella ictaluri</i>	-	-
7	嗜冷屈挠杆菌 <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	-	-
8	绿针假单胞菌 <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	-	-
9	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
10	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	-	-
11	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
12	表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
13	鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	-	-
14	病海鱼弧菌 <i>Vibrio ordalii</i>	-	-
15	海弧菌 <i>Vibrio pelagius</i>	-	-
16	鲁式耶尔森氏菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	-	-

2.3 灵敏度试验

把浓度为 $1.8 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的鲑肾杆菌菌悬液,按10倍梯度做系列稀释后,取各稀释度的菌悬液,经酚抽提后,以BKDR和BKDF为引物,结果显示,PCR检测灵敏度达 $1.8 \times 10^3 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取各稀释度的菌悬液,分别作冻融、煮沸、煮沸后冻融的处理后,直接作为模板,用BKDR和BKDF为引物,结果显示,经冻融或煮沸处理的菌悬液,PCR检测灵敏度仅达 $1.8 \times 10^5 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而经煮沸后冻融处理过的菌悬液检测灵敏度较高,与酚抽提相当。

取上述以BKDR和BKDF为引物,PCR扩增的产物,作为模板,用BKDR2和BKDF2为引物,作nested-PCR,结果显示,检出灵敏度均比未作nested-PCR扩增要提高100倍左右(表3)。

表3 比较用不同方法处理鲑肾杆菌后对PCR和nested-PCR检测灵敏度的影响

Tab. 3 The effect on the sensitivity of PCR and nested PCR with templates treated by different methods

菌悬液浓度($\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) concentration of bacterial suspension	模板制备方法 template method				
	酚抽提法 phenol chloroform isopentanol		冻融法 freezing thawing	煮沸法 boiling	冻融加煮沸 freezing thawing and boiling
1.8×10^7	+	+	+	+	+
1.8×10^6	+	+	+	+	+
1.8×10^5	+	+	+	+	+
1.8×10^4	+	+	-	-	+
1.8×10^3	+	+	-	-	+
1.8×10^2	-	+	-	-	-
1.8×10^1	-	+	-	-	-
1.8×10^0	-	-	-	-	-

注: + + / + + 表示 PCR 结果/nested-PCR 结果

Notes: + + / + + means the results of PCR/the results of nested-PCR

2.4 在鱼卵中的检出情况

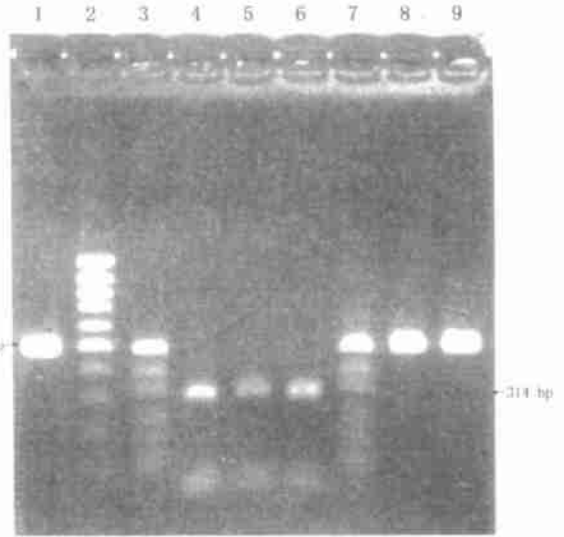
将 20 μL $1.8 \times 10^7 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液与 0.02 g 鲑鱼卵的卵膜混合物,经酚抽提后,作为模板,PCR 扩增和 nested PCR 扩增结果均显示出特异性的 DNA 片段,而且背景非常干净(图版)。

3 讨论

早在 20 世纪 30 年代,就发生了鲑鱼肾杆菌病,并在许多国家陆续发生。但对其病原的研究却开展得比较缓慢,这主要是由于其病原——鲑鱼肾杆菌难以培养,生长缓慢。Earp 等^[3]先是用磨碎的鸡胚制备培养基,但培养效果很差,随后在 Dorset 卵胚培养基中加入 0.05% ~ 0.1% (w/v) 的 L-半胱氨酸、胰蛋白胨和酵母提取物,成功地用 3-4 周的时间培养出来^[4]。Evelyn 等^[5]排除 NaCl,用蛋白胨代替胰蛋白胨和浓缩牛肉汁,制备 KDM2 培养基,取得了更加满意的培养效果,并且一直使用至今。在 KDM2 培养基中加入 3% 经过高压灭菌的 KDM2 培养液,可有效的促进细菌的生长^[6,7]。我们用这一方法培养鲑鱼肾杆菌,培养时间可缩短至 3~ 5d。

虽然用分离、培养和生化性状的常规方法鉴定细菌是最为可靠的方法,但在日常检验、检疫工作中,用常规方法远远不能满足快速检测的需要。免疫学方法可以在一定程度上缩短检验的时间。就灵敏度而言,酶联免疫吸附技术要高于免疫荧光、反向免疫凝胶电泳和免疫扩散^[8]。但鲑鱼肾杆菌与很多常见鱼类致病菌都存在有交叉反应,从而使鲑鱼肾杆菌的免疫学检测方法受到很大的局限性^[9,10]。

分子生物学检测技术,尤其是 PCR 的出现使鲑鱼肾杆菌检测方法的研究进入了一个快速发展的时期。Magnussen 等^[11]使用 nested RT-PCR 扩增 16S rRNA 序列,可在卵巢液中检出细菌,但不能检出肾脏中的细菌。57 kDa 可溶蛋白(p57)是鲑鱼肾杆菌表面的主要蛋白,在编码 p57 的 DNA 中设计不同的特异性引物,扩增不同长度的片段,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^[12-14]。Brown 等^[12]设计的引物 BKDR 和 BKDF 扩增 p57 蛋白编码基因的 501 bp,有较强的特异性,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^[2]。我们在 501bp 的片段中,又设计了一对编码 314 bp 的引物 BKDR2 和 BKDF2,用来进一步扩增 BKDR 和 BKDF 的扩增产物,结果显示,可有效地提高检测灵敏度。用冻融煮沸法直接处理得到的裂解液,可直接用来作为模板使用,从而在不影响检测灵敏度的前提下,进一步缩短检测时间。nested PCR 可用来直接检测组织中鲑鱼肾杆菌的存在,这一点在本试验中得到了初步证实,但还有待于完善和进一步验证。我国还未见有检出鲑鱼肾杆菌的报道,但怀疑在个别省份的牙鲈有可能感染鲑鱼肾杆菌,并为此影响到牙鲈鱼的出口。因此建立起准确、快速检测鲑鱼肾杆菌的方法,是非常紧迫和必要的。今后的研究中,我们将继续摸索试验条件,希望能够制备出更加准确、实用、快速的检测试剂盒。



图版 Plate

从左到右: 1. 鲑鱼肾杆菌 PCR 扩增 501bp 的片段; 2. 1 kb of DNA Marker (pUC19 DNA/MspI [HpaII] Marker, 从上至下依次为 1kb、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp); 3. 500 bp of DNA Marker (GenRulerTM 500 bp DNA Ladder, 从上至下依次为 501、404、331、242、190、147 bp); 4. 鲑鱼肾杆菌 PCR 扩增 314 bp 的片段; 5, 6. 带有鲑鱼肾杆菌的鳕鱼卵, 扩增出 314 bp 的 DNA 片段; 8, 9. 从带有鲑鱼肾杆菌的鳕鱼卵, 扩增出 501 bp 的 DNA 片段。From Left to right: 1. 501 bp fragment of *R. salmoninarum* amplified by PCR; 2. 1 kb of DNA Marker (pUC19 DNA/MspI [HpaII] Marker, from up to down is 1 kb, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp); 3. 500 bp of DNA Marker (GenRulerTM 500bp DNA Ladder, from up to down is 501, 404, 331, 242, 190, 147bp); 4. 314 bp fragment of *R. salmoninarum* amplified by nested PCR; 5, 6. 314 bp fragment of *R. salmoninarum* from cod eggs amplified by nested PCR; 8, 9. 501 bp fragment of *R. salmoninarum* from cod eggs amplified by PCR.

参考文献:

- [1] Austin A, Austin D A. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish[M]. Praxis Publishing Ltd, Chichester, 1999. 17- 18.
- [2] OIE diagnostic manual for aquatic animal diseases(3rd ed)[M]. Office International des Epizooties Paris France, 2000. 94- 104.
- [3] Earp B J, Ellis C H, Ordal E J. Kidney disease in young salmon[R]. Washington, Department of Fisheries(Special Report I). 1953. : 1- 74.
- [4] Ordal E J, Earp B J. Cultivation and transmission of etiological agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes[J]. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine, 1956. 92: 85- 88.
- [5] Evelyn T P T. An improved growth medium for the kidney bacterium and some notes on using the medium[J]. Bulletin de l' Office International des Epizooties, 1977, 87: 511- 513.
- [6] Evelyn T P T, Prosperi Porta L. Inconsistent performance of KDM2, a culture medium for the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*, due to variation in the composition of its peptone ingredient[J]. Disease of Aquatic Organisms, 1989, 7: 227- 229.
- [7] Evelyn T P T, Prosperi Porta L, Ketcheson J E. Two new techniques for obtaining consistent results when growing *Renibacterium salmoninarum* on KDM2 medium[J]. Dis Aquat Org, 1990, 9: 209- 212.
- [8] 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 fishes in Alaska, USA [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1993, 16: 181- 189.
- [9] Austin B, Rayment J. Epizootiology of *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish[J]. J Fish Dis, 1985, 8: 505- 509.
- [10] Yoshimizu M, Nomura R J, Kimura T. A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for *Renibacterium salmoninarum* ATCC33209 caused by a *Pseudomonas* sp[J]. Scientific Report of the Hokkaido Salmon Hatchery, 1987, 41, 121- 127.
- [11] Magneussen H B, Fridjonsson O H, Andreasson O S, et al. *Renibacterium salmoninarum*, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish, detected by nested reverse transcriptase PCR of 16S rRNA sequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 4580- 4583.
- [12] 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.
- [13] McIntosh D, Meaden P G, Austin B. A simplified PCR-based method for the detection of *Renibacterium salmoninarum* utilizing preparations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) lymphocytes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62: 3929- 3932.
- [14] Pascho R, Chase J D, McKibben C L. Comparison of the membrane filtration fluorescent antibody test, the enzyme linked immunosorbent assay, and the polymerase chain reaction to detect *Renibacterium salmoninarum* in salmonid ovarian fluid[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigations, 1998, 10: 60- 66.

欢迎订阅 2003 年《现代渔业信息》

《现代渔业信息》是农业部主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办和农业部东海区渔政渔港监督管理局、农业部黄渤海区渔政渔港监督管理局、江苏省海洋与渔业局等四十七个单位协办的一本供全国农、林、水系统各级领导、高等院校教师、科技人员以及生产单位工作者参阅的渔业科技综合信息刊物。报导内容侧重于国内外渔业生产、水产科学技术的新动态、新工艺、新材料和新方法等信息；同时报导国内外渔业生产、科技及教育等方面的进展动态。

《现代渔业信息》为月刊，大 16 开。国际标准刊号：ISSN 1004- 8340，国内统一刊号：CN 31- 1465/ S。每期定价 4.00 元，全年 12 期共 48.00 元。订阅者请到当地邮局办理订阅。若当地邮局订阅不便，也可与本编辑部发行部联系办理订阅。

编辑部地址：上海市军工路 300 号，邮编：200090

电话：021- 55530500，传真：021- 65683926

联系人：徐吟梅