

文章编号: 1674-5566(2010)05-0601-07

利用 LAMP法快速检测致病性哈维氏弧菌

张静^{1,2}, 施慧², 谢建军², 许文军^{1,2}

(1. 浙江海洋学院, 浙江舟山 316000)

2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316100)

摘要: 从浙江宁波的发病鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 分离到 1 株致病性哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) LY-1。从该菌的 DNA 样本中成功扩增出大小为 873 bp 的 *ToxR* 基因片段。DNA 序列分析表明: 该序列与已登录哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) *ToxR* 基因同源率为 96.57%, 与副溶血弧菌 (*V. Parahaemolyticus*)、鳗弧菌 (*V. anguillarum*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、费氏弧菌 (*V. fisheri*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、霍利斯弧菌 (*V. hollisae*)、拟态弧菌 (*V. mimicus*)、河弧菌 (*V. fluvialis*) 的 *ToxR* 基因相似性为 27.62% ~ 72.49%。选择哈维氏弧菌 *ToxR* 基因种内保守区段, 设计 1 套环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification LAMP) 技术的特异引物, 对扩增条件进行优化实验, 在 65 °C 孵育 45 min 的条件下即可完成哈维氏弧菌特异性扩增, 成功建立了海水致病菌—哈维氏弧菌的 LAMP 快速检测方法。结果分析表明: 该方法对哈维氏弧菌 DNA 的最小检出量为 1 拷贝, PCR 法灵敏度高 3 个数量级。利用 LAMP 方法快速检测哈维氏弧菌, 目前在国内外还未见报道。

关键词: 哈维氏弧菌; *ToxR* 基因; LAMP 快速检测方法

中图分类号: S941.4 **文献标识码:** A

Rapid detection of pathogenic *Vibrio harveyi* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

ZHANG Jing^{1,2}, SHI Hui², XIE Jian-jun², XU Wen-jun^{1,2}

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

2. Marine and Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: A pathogenic *Vibrio harveyi* strain LY-1 was originally isolated from diseased *Lateolabrax japonicus* cultured in Ningbo, Zhejiang Province. 873 bp-length fragment of *ToxR* gene cloned from the DNA of *V. harveyi* strain LY-1 was sequenced and showed that it shared high identity of 99% to those of *V. harveyi* in GenBank and had lower similarities to those of *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. fisheri*, *V. alginolyticus*, *V. hollisae* and *V. mimicus* with only 27.62% ~ 72.49% identity. A set of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers were designed and synthesized based on the conservative sections of *V. harveyi ToxR* gene, and the LAMP for detection of *V. harveyi* was developed after optimizing the factors. LAMP required only a incubation at 65 °C for 45 min, and its detection limit for *V. harveyi* DNA was 1 copy.

收稿日期: 2009-09-11

基金项目: 浙江省科研院所公共科技服务项目 (2008F4003); 浙江省大学生新苗计划项目 (2008R40G2110020); 浙江省科技厅一般科研项目 (2009C32062); 浙江省海洋渔业局海洋与海岛管理项目 (浙海渔计 2008-130)

作者简介: 张静 (1984-), 女, 硕士研究生, 专业方向为海水养殖病害。E-mail: zhangjinq013@163.com

通讯作者: 许文军, Tel: 0580-3055554, E-mail: xwenjun@sina.com

which was found to be more sensitive than the commonly used PCR method. To date, this is first report that LAMP method is used to detect *V. harveyi* rapidly.

Key words: *Vibrio harveyi*; ToxR; LAMP; rapid detection

哈维氏弧菌病是鱼、虾等海水养殖动物的主要细菌性疾病之一,由于其流行范围广,死亡率高,给海水养殖业带来了极大的威胁,并造成巨大损失^[1],建立病原的快速诊断技术对于疾病的防控意义重大。有关病原细菌的诊断方法通常包括常规生理生化鉴定、PCR免疫诊断技术等^[2],但是这些检测方法操作相对较为烦琐、耗时较长,而且需要昂贵的仪器、试剂和具有丰富操作经验的专业人员等,大多局限于一些科研和专门检测机构,难以在基层和生产单位推广应用,因此建立一种更快速、更准确、更简便的检测方法,以满足基层水产养殖疾病防控的需求成为迫切需要。

LAMP技术是一种新的恒温扩增方法。由于LAMP技术特异性强、灵敏度高、快速及操作简单等优点,自2000年首次报道^[3]以来,已经在核酸研究、疾病诊断、性别鉴定、转基因及病原检测等领域广泛应用^[4-7]。近年在水产养殖领域应用也迅速发展,2004年LAMP技术首次被应用于牙鲆病原菌——爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)^[8]的检测,此后鲟鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)^[9]、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)^[10]、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)^[11]、溶藻弧菌^[12]等病原菌的LAMP法检测相继报道。有关哈维氏弧菌的LAMP检测方法,目前国内外还未见文献报道。本研究通过对哈维氏弧菌毒力调控基因ToxR基因序列分析,选择哈维氏弧菌ToxR基因保守片段设计特异性引物,首次建立了LAMP检测哈维氏弧菌的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株LY-1分离自宁波象山网箱养殖发病鲈鱼,经生理生化及分子生物学鉴定为哈维氏弧菌^[13],其他病原菌株分离自浙江宁波、舟山和佛度等沿海养殖场发病的鲈鱼、黑鲷等海水养殖动物,副溶血弧菌标准菌株由舟山市疾病预防控制中心惠赠。哈维氏弧菌、鳃弧菌、费氏弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌标准菌株由中国海洋大学惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA聚合酶、dNTP、T₄DNA连接酶、X-gal、IPTG等购自上海生物工程有限公司, BstDNA聚合酶, XbaI内切酶购于New England生物实验室, pGEM-T Easy载体(Promega公司), Betaine(Sigma Aldrich), Agarose(BB公司), PCR LAMP引物合成均在上海生物工程有限公司。

BD-RAD PCR仪(PTC200), BIO-RAD凝胶成像系统, BIO-RAD电泳仪。

1.3 哈维氏弧菌 ToxR基因克隆及序列分析

哈维氏弧菌LY-1染色体DNA提取、PCR扩增、克隆等分子生物学操作按分子克隆试验指南进行。参考从GenBank下载的已登录哈维氏弧菌及其他弧菌ToxR基因全长序列,设计一对引物:上游引物ToxR F1: 5'-ATCGGCACCAATTTCTGCT-3' 下游引物ToxR R2: 5'-TCAGCCCTAATGCAAATG-3' 扩增片段大小为873 bp(图1)。PCR反应体系为25 μL: 10× PCR缓冲液2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL, 引物(5 μmol/L)各0.5 μL, TaqDNA聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, DNA模板1 μL, 双蒸水补足反应体系。PCR扩增程序为94℃ 5 min; 94℃ 45 s; 54℃ 30 s; 72℃ 1 min进行30个循环; 72℃延伸10 min。

将目的PCR产物电泳分离、纯化后,连接pGEM-T Easy载体, CaCl₂法转化JM109大肠杆菌感受态细胞,选择阳性转化子,由上海生物工程有限公司进行序列测定。

1.4 模板制备、特异性引物设计与合成

1.4.1 模板制备

以1.3操作中获得的阳性质粒克隆作为以下LAMP反应模板。

1.4.2 引物设计与合成

根据所测哈维氏弧菌ToxR基因序列,并与其他ToxR基因进行序列同源性比较,选择一段种内保守区段采用LAMP引物在线设计软件Primer Explorer 3设计一套LAMP特异性引物。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。各引物的序列见表1。

```

345 TTCTGAAGCA GCACCTCACCG ATGTTGATGC TCAAGAGGAA*
          F3                      F2*
385 GAAAATGAAG CTCCAGTCGT TGAT*CTAGAG CAATTCGCAG*
          XbaI                      F1c 互补链*
425 AGCCCACTGC TGAGACAAAA GCAGAAACAG COGTCGAAACA*
          B1c*
465 AGCACCGACA GCTCAACCAT TAAAATCTGC ACCTGCACAA*
          B2 互补链                      B3 互补链*
505 AAGAACAC*

```

图 1 用于 LAMP外部引物 (FIP和 BIP)与内部引物 (F3和 B3)设计的部分 *ToxR*基因序列
Fig 1 Nucleotide sequence of partial *ToxR* Gene and its inner (FIP and BIP) and outer (F3 and B3) Primers for LAMP

表 1 LAMP所用引物
Tab 1 Oligonucleotide primer for LAMP

引物	引物序列 (5' - 3')
F3	TTCTGAAGCA GCACCTCAC
B3	GTTTCTTTTGTGTCAGGTG
FIP	TCTGCGAATTGCTCTAGATCAAC-TTTT-CGATGTTGATGCTCAAGAG
BIP	CCACIGCTGAGACAAAAGCA-TTTT-ATTTTAAATGG TTGAGCTGTCG

1.5 LAMP反应及条件优化

1.5.1 LAMP扩增

LAMP反应体系 25 μ L: 10 \times Thermo Pol buffer 2.5 μ L、dNTP (10 mmol/L) 2.5 μ L、MgSO₄ (0.15 mol/L) 1 μ L、Betaine (8 mol/L) 5 μ L、内引物 (10 μ mol/L) 各 4 μ L、外引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L、模板 1 μ L、ddH₂O 3 μ L、混匀, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后冰浴 2~3 min, 加入 8 U Bst DNA polymerase, 65 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 80 $^{\circ}$ C 终止反应 10 min。产物肉眼观察反应情况, 同时于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5.2 条件优化实验

分别改变反应时间、MgSO₄ 浓度、dNTP 浓度、Betaine 浓度、内外引物浓度等 LAMP 扩增条件, 电泳观察扩增产物的质和量。

1.6 PCR扩增

PCR扩增引物为: *ToxR*F₂: 5-ATCTTCTGAA GCAGCACCTCAC-3, *ToxR*R₂: 5-ACTGGTGAAGAC TCAGCAGCA-3。反应体系 25 μ L: 10 \times PCR缓冲液 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, *ToxR*F₂/*ToxR*R₂ 引物 (5 μ mol/L) 各 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, 模板 1 μ L, 双蒸水补足反应体系。PCR扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 特异性实验

用 1.5 建立的 LAMP 方法分别对哈维氏弧菌 LY-1 及哈维氏弧菌, 副溶血弧菌, 费氏弧菌, 创伤弧菌, 溶藻弧菌和鳃弧菌 6 株标准菌株进行扩增, 验证方法特异性。

1.8 灵敏度验证

将实验用 DNA 模板原始浓度 (10 ng/ μ L) 进行 10 倍梯度稀释, 分别作为模板, 进行 LAMP 和常规 PCR 扩增, 比较两者灵敏度差异。PCR 反应条件和体系见 1.6, LAMP 反应条件和体系见 1.5。

1.9 LAMP产物的酶切鉴定

利用限制性内切酶 XbaI 对 LAMP 扩增产物进行酶切鉴定。反应体系为 20 μ L 包括: 10 \times NEB Buffer 2 μ L, 100 \times BSA 0.2 μ L, XbaI 内切酶 0.5 μ L, LAMP 扩增产物 1 μ L, ddH₂O 16.3 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应条件下作用 1.5 h 电泳观察酶切结果。

2 结果

2.1 哈维氏弧菌 *ToxR* 基因克隆及序列分析

将阳性克隆进行序列测定。用 DNASTar 软件进行分析, 得到序列长度为 873 bp 的 *ToxR* 基因片段。将所得 *ToxR* 基因序列与基因库中已登录的哈维氏弧菌及其他弧菌 *ToxR* 基因序列进行同源性分析, 结果显示, 其 *ToxR* 基因编码序列与

已登录哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) *ToxR*基因同源性为 96.57%，与副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 的 *ToxR*基因同源性为 72.49%，与鳗弧菌 (*V. anguillarum*) *ToxR*基因同源性为 60%，与创伤弧菌 (*V. vulnificus*) 的 *ToxR*基因同源性为 59%，与

费氏弧菌 (*V. fisheri*)、溶藻胶弧菌 (*V. algolyticus*)、霍利斯弧菌 (*V. hollisae*)、拟态弧菌 (*V. mimicus*)、河弧菌 (*V. fluvialis*) 的 *ToxR*基因相似性相对较低，仅为 27.62%~58.55% (表 2)

表 2 哈维氏弧菌 LY-1 *ToxR*基因与 GenBank 中 9 种弧菌相应基因序列的同源性
Tab 2 Homology in *ToxR* gene between *V. harveyi* LY-1 and those of 9 *Vibrio* in GenBank %

菌株	溶藻弧菌	鳗弧菌	费氏弧菌	河弧菌	霍利斯弧菌	拟态弧菌	副溶血弧菌	创伤弧菌	哈维氏弧菌
哈维氏弧菌 LY-1	58.55	60.07	27.62	56.15	49.10	38.30	72.49	59.03	96.57

使用 DNAMAN 软件对哈维氏弧菌 LY-1 *ToxR* 氨基酸序列与 8 种其他弧菌的 *ToxR* 氨基酸序列进行序列比对，结果显示 (0-60) 位，(110-180)

位，(275-310) 位氨基酸序列呈现种间高度变异性 (图 2)。该结论为特异性引物的设计提供了依据。

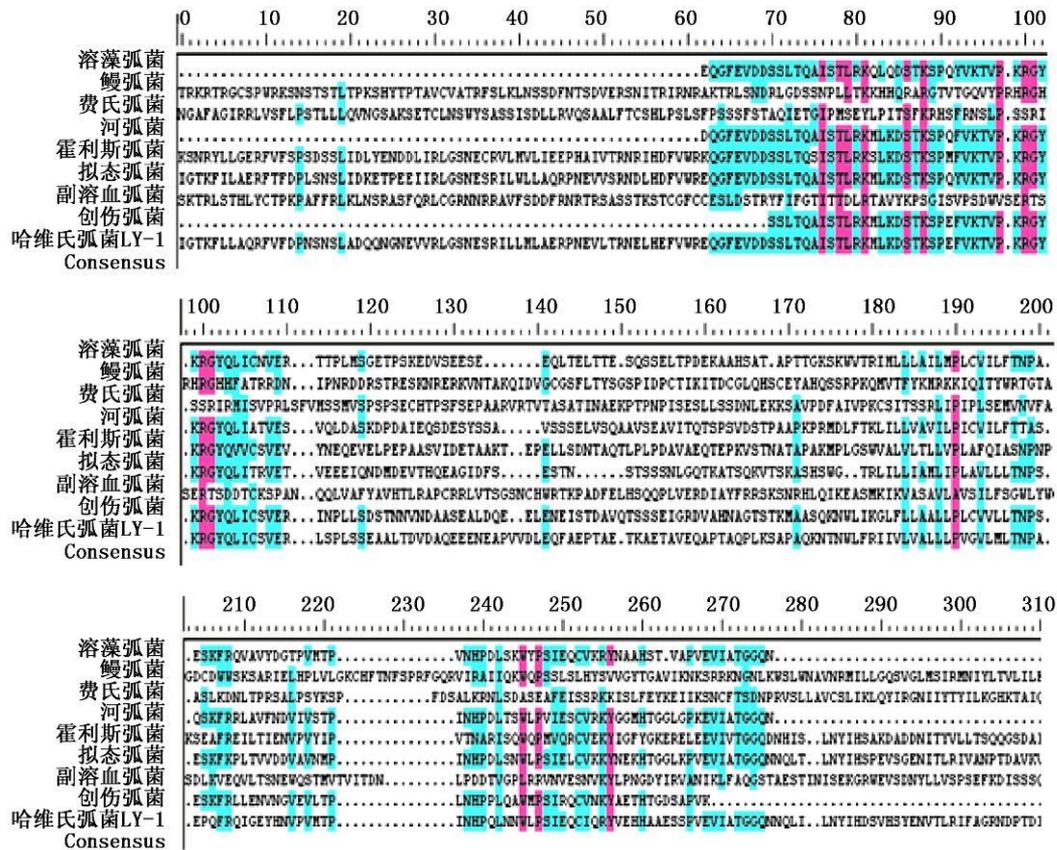


图 2 哈维氏弧菌 LY-1 与 8 种弧菌 *ToxR* 氨基酸序列分析

Fig 2 Analysis of *ToxR* amino acid sequence between *V. harveyi* LY-1 and the other 8 *Vibrio*

2.2 LAMP 检测方法的建立

根据哈维氏弧菌 *ToxR* 基因的保守区段 168 bp (345~512 bp) 的核苷酸序列，设计特异性引物，LAMP 扩增结果肉眼观察，以哈维氏弧菌 LY-1 基因组 DNA 为模板的反应体系见白色沉淀，加入 SYBR Green 后呈绿色；以水作为模板的阴性对照组无白色沉淀产生，加入 SYBR Green 后呈

橙色，表明无扩增。分别取 5 μL 反应产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示：哈维氏弧菌 LY-1 基因组 DNA 泳道产生梯状条带，以水作为模板的阴性对照未产生条带，表明此套 LAMP 引物能够有效地扩增哈维氏弧菌 *ToxR* 基因 (图 3)。

在不同的内外引物浓度、反应时间、镁离子浓度、dNTP 浓度、Betaine 浓度下扩增 (图 4)，最

终确定 LAMP反应条件为: 25 μ L 反应体系, 包括: 10 \times ThermoPol buffer 2.5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2.5 μ L, MgSO₄ (0.15 mol/L) 0.5 μ L, Betaine (8 mol/L) 3.8 μ L, 内引物 (10 μ mol/L) 各 4 μ L, 外引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 4.7 μ L, 混匀, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后冰浴 2~3 min, 加入 8 U Bst DNA 酶, 65 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, 80 $^{\circ}$ C, 10 min 终止反应。

2.3 特异性结果

选择哈维氏弧菌, 副溶血弧菌, 费氏弧菌, 创伤弧菌, 溶藻胶弧菌和鳃弧菌, 6种 ToxR 基因同源性较高的常见海水致病弧菌标准菌株来验证 LAMP 反应的特异性。结果表明, 哈维氏弧菌 LY-1、哈

维氏弧菌标准菌株 LAMP 反应结果均呈阳性, 其他弧菌标准株均无扩增 (图 5)。

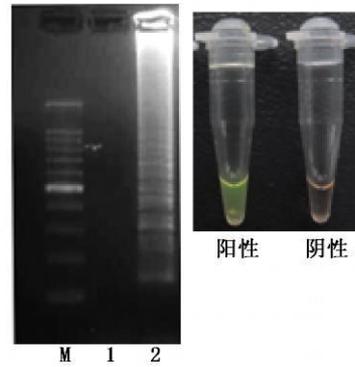


图 3 LAMP 检测结果
Fig 3 The detected result of LAMP
M: 100 bp Marker; 1: 阴性对照; 2: 哈维氏弧菌 LY-1

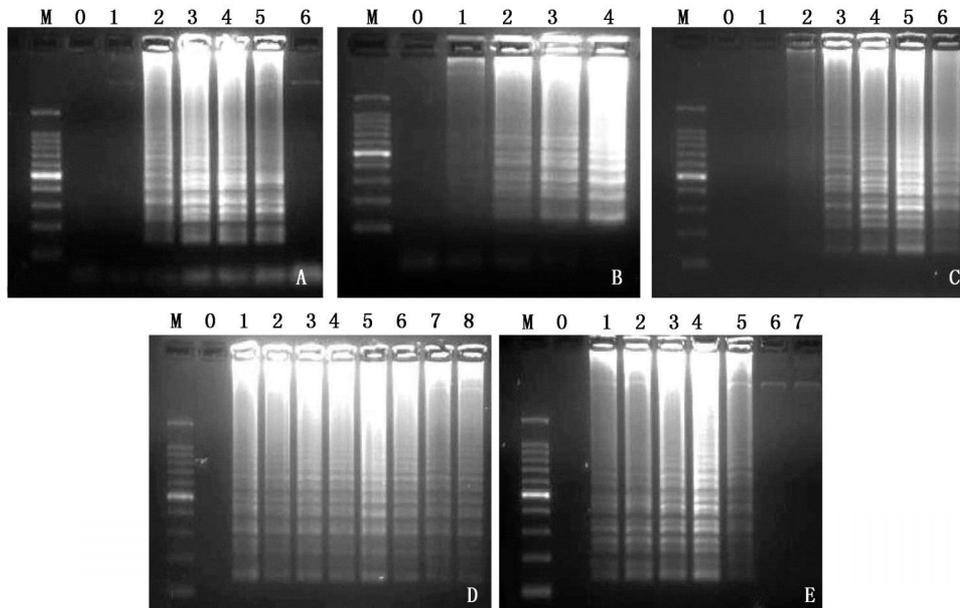


图 4 LAMP 扩增条件优化
Fig 4 Optimization of the LAMP amplification

M: 100 bp Marker; 0: 阴性对照; A: Mg²⁺ 浓度对 LAMP 扩增的影响; 1-6 镁离子终浓度分别为 0 mmol/L, 1.5 mmol/L, 3 mmol/L, 4.5 mmol/L, 6.0 mmol/L, 7.5 mmol/L; B: 反应时间对 LAMP 扩增的影响; 1-4 扩增时间分别为 30 min, 45 min, 60 min, 90 min; C: 内外引物浓度比对 LAMP 扩增的影响; 1-6 外内引物浓度比分别为 (1:1), (1:2), (1:4), (1:6), (1:8), (1:10); D: 甜菜碱浓度对 LAMP 扩增的影响; 1-8 甜菜碱分别为 0 mol/L, 0.6 mol/L, 0.8 mol/L, 1.0 mol/L, 1.2 mol/L, 1.4 mol/L, 1.6 mol/L, 1.8 mol/L; E: dNTP 对 LAMP 扩增的影响; 1-7 dNTP 分别为 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L, 1.4 mmol/L, 1.6 mmol/L。

2.4 灵敏度结果

在 25 μ L 反应体系中, 模板 DNA 量分别为 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag 和 10 ag。由图可知, PCR 的最小检出量为 1 pg, 以该 PCR 产物为模板进行二次 PCR 反应, 反应体系与条件同前。结果显示, 二次 PCR 最小

检出量为 100 fg (图 6-7)。LAMP 产物电泳结果显示, LAMP 检测哈维氏弧菌的最小检出量为 1 fg (图 8), 为 PCR 检测灵敏度的 1 000 倍。

2.5 酶切鉴定

为了确定所得产物为目的扩增产物, 我们采用限制性内切酶 XbaI 进行酶切鉴定。XbaI 内切

酶位于引物 F1 上(图 1), 根据 Notm 等^[3] 已报道的计算方法, 经 Xba 酶切后可得到大小为 63 bp 97 bp 102 bp 121 bp 片段。酶切产物电泳后得到与预期相同的片段(图 8), 表明建立的 LAMP 扩增为目的扩增。

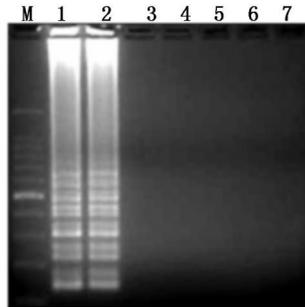


图 5 LAMP 特异性试验结果

Fig 5 The results of specificity test on LAMP
M 100 bp marker 1-7 分别为 哈维氏弧菌 LY-1、哈维氏弧菌、创伤弧菌、鳗弧菌、费氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血弧菌。

3 讨论

ToxR 基因是弧菌属细菌的一种调控基因, 目前已发现存有 ToxR 基因的弧菌除哈维氏弧菌之外, 还有副溶血弧菌, 费氏弧菌, 创伤弧菌, 溶藻胶弧菌, 霍利斯弧菌, 拟态弧菌, 河弧菌、鳗弧菌和一种深海中的光合细菌等^[14]。Kim 等^[15] 发现 ToxR 基因在弧菌种间高度保守, 其种间同源性远远低于 rRNA 因此能够被有效用于弧菌的种间鉴定。之后, Vuddhakul^[16]、Conejero^[17] 等分别利用 ToxR 基因设计 PCR 引物, 成功建立了霍利斯弧菌、哈维氏弧菌快速检测方法。本研究将克隆得到的哈维氏弧菌 LY-1 ToxR 基因序列与 GenBank 中已发表的其他弧菌 ToxR 基因进行序列比对, 发现其在 (0-60), (110-180), (275-310) 位氨基酸序列呈现种间高度变异性。利用 (110-180)

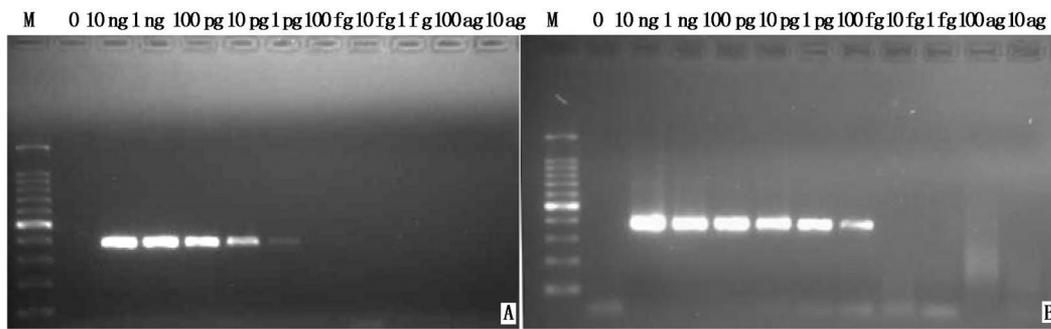


图 6 A 与 B 分别为 PCR 与二重 PCR 法灵敏度实验结果

Fig 6 A and B results of detection limit of PCR and duplex PCR respectively

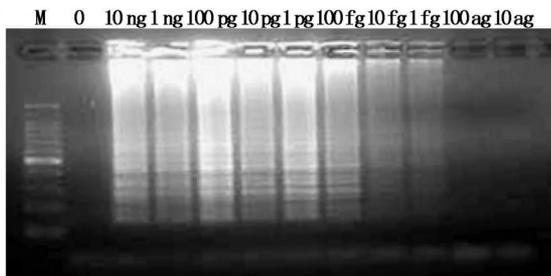


图 7 LAMP 法灵敏度实验结果

Fig 7 Results of detection limit of LAMP amplification

位保守序列设计一套 LAMP 引物进行特异性扩增, 结果从哈维氏弧菌中扩增出特异性片段, 而从其他的弧菌标准菌株中扩增不出该片段, 再次证明 ToxR 基因作为弧菌种间鉴定依据的可行性。

LAMP 技术作为一种新的恒温扩增方法, 近

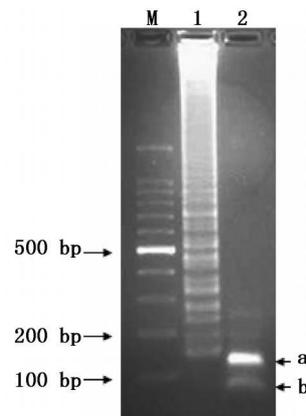


图 8 LAMP 产物的 Xba 酶切分析

Fig 8 Analysis of LAMP products digested with XbaI
M 100 bp marker 1 LAMP 产物; 2 Xba 酶切产物。

年在水产养殖领域应用迅速发展。利用 LAMP

技术检测爱德华氏菌^[8]、鲈鱼诺卡氏菌^[9]、柱状黄杆菌^[10]、嗜水气单胞菌^[11]、溶藻弧菌^[12]等病原菌的文献相继报道。本文利用哈维氏弧菌 ToxR 基因保守片段设计一套 LAMP 引物,首次建立了哈维氏弧菌的 LAMP 检测方法。经验证:本方法具有操作简单,仪器设备要求低,灵敏度高等特点。实验仅需恒温水浴装置 65 °C 恒温作用 45 min 即可完成扩增,结果可直接通过肉眼观察沉淀有无情况或加入 SYBR Green 后观察反应体系颜色变化判断,实现反应及产物检测一步完成,哈维氏弧菌的最小检出量为 1 个,为常规 PCR 检测灵敏度的 1 000 倍,与常规哈维氏弧菌检测方法^[18]相比大大提高了检出效率,缩短了检出时间与检测成本,更适用于水生动物疾病即时、现场、快速检测。

LAMP 技术在具有众多优点的同时,也有自身的局限性,如 LAMP 扩增体系易污染;反应体系构成较复杂,建立难度较大等。本研究在哈维氏弧菌 LAMP 检测方法的建立过程中得出:实验过程中需要确保操作的严谨性,尽量做到加样和反应在不同的空间区域进行,LAMP 反应更适用于基层或养殖场等野外较大空间条件下的疾病现场快速检测;LAMP 反应体系中 Mg²⁺、dNTP 的浓度以及内外引物浓度比都对 LAMP 反应影响较大,浓度过高或过低都不利于反应的进行,甚至会终止反应,认真优化各实验条件是成功建立 LAMP 检测方法的关键。总之,只要引物设计合理、实验操作严谨,反应条件合理,就能避免 LAMP 反应过程中出现体系易污染和扩增体系难建立等问题,得到理想的实验目标。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens Mj. 3 ed. Chichester: Praxis Publishing Ltd, 1999.
- [2] 王瑞旋,徐力文,冯娟.海水鱼类细菌性疾病病原及其检测、疫苗研究概况[J].南方水产,2005 1(6):72-79.
- [3] Nom i T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 28-63.
- [4] Endo S, Komo fi T, Rice i G, et al. Detection of 8q43 of Paracoccid ioides brasiliensis by the Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. FEMS Microbiology Letters 2004 234(1):93-97.
- [5] HamKudo Y, Yoshino M, Kojima T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella [J]. FEMS Microbiology Letters 2005 253: 155-161.
- [6] Inai M, Ninom iya A, Minekawa H, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. Journal of Virological Methods 2006 24(44):6679-6682.
- [7] Hirayama H, Kageyama S, Takahashi Y, et al. Rapid sexing of water buffalo (Bubalus bubalis) embryos using loop-mediated isothermal amplification[J]. Theriogenology 2006 66: 1249-1256.
- [8] Savan R, Igarashi A, Matsuda S, et al. Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop mediated isothermal amplification method[J]. Appl Environ Microbiol 2004, 70(1): 621-624.
- [9] Imano T, Kawakami H, Kono T, et al. Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal Amplification[J]. Journal of Applied Microbiology 2006 100(6): 1381-1387.
- [10] Yeh H Y, Shomaker C A, Klesius P H. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel fish Ictalurus punctatus important bacteria pathogen Edwardsiella ictaluri[J]. Journal of Microbiological Methods 2005 63: 36-44.
- [11] 程天印,刘洵,常小斌.嗜水气单胞菌 LAMP 检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2007 37(12):1013-1016.
- [12] 丁文超,胡健饶,史雨红.环介导恒温扩增技术快速检测溶藻弧菌[J].分子细胞生物学报,2009 42(1):70-76.
- [13] 张静,施慧,谢建军,等.网箱养殖鲈鱼内脏白点病原的分离与鉴定[J].浙江海洋学院学报,2009 28(2):176-182.
- [14] Osorio C R, Klose K E. A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among Vibrio species[J]. J Bacteriol 2000 182: 526-528.
- [15] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of Vibrio parahaemolyticus strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene[J]. Clin Microbiol 1999 37: 1173-1177.
- [16] Vuddhakul V, Nakai T, Matsumoto C, et al. Analysis of the gyrB and toxR gene sequences of Vibrio cholerae and the development of the gyrB and toxR-targeted PCR methods for the isolation and identification of V. cholerae from the environment[J]. Appl Environ Microbiol 2000 66: 3506-3514.
- [17] Conejero M, Ju H, Hedrevida C T. Isolation of partial toxR gene of Vibrio Harveyi and design of toxR-targeted PCR primers for species detection[J]. Journal of Applied Microbiology 2003 95(3): 602-611.
- [18] 陈吉祥,杨慧,颜显辉.致病性哈维氏弧菌溶血素基因克隆及其检测[J].中国水产科学,2005 12(5):580-587.