

现代微生物识别技术在水产养殖环境研究中的应用

汤学敏 郑江* 郝聚敏 黎中宝 李玉宝

(集美大学 水产学院 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 福建 厦门 361021)

摘要: 养殖环境的恶化已成为制约水产业健康发展的瓶颈。鉴于微生物在养殖水体中的重要作用, 本文从技术角度对近年来发展起来的现代微生物分子识别技术进行了概括介绍, 并综述了以核酸为靶分子和以微生物表面抗原为靶分子的两类微生物识别技术在水产养殖中的应用进展, 为水产养殖环境的改善及其病害防治提供参考。

关键词: 微生物, 识别技术, 水产养殖环境

Applications of modern microbial identification technology in research of aquaculture environment

TANG Xue-Min ZHENG Jiang* HAO Ju-Min LI Zhong-Bao LI Yu-Bao

(Key Laboratory of science and Technology for Aquaculture and Food Safety in Fujian Province, Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

Abstract: Pollution of the aquaculture environment has been a serious problem for the future development of aquaculture industry. Because of the significant importance of microorganisms in the environment of aquaculture, this paper provides an overview of modern microbial recognition technology from the technical aspects. According to the targets, the microbial recognition technology was divided into two types: one targetting nucleotides of microorganisms, the other targetting the surface antigens of microorganisms. The application of the two technologies was also summarized in the present paper, which could provide a reference for the improvement of aquaculture environment and the control of the disease in the aquaculture animals.

Keywords: Microorganism, Recognition technology, Aquaculture environment

基金项目: 福建省科技计划重点项目(No. 2010Y0039); 福建省教育厅科技项目(No. JB10096); 集美大学科研启动基金项目(No. ZQ2011002); 集美大学创新团队项目(No. 2010A004)

*通讯作者: ✉: zhengjiang618@163.com

收稿日期: 2011-10-24; 接受日期: 2012-02-13

中国是一个水产养殖大国,产量约占世界的2/3。近年来,伴随着我国水产养殖规模的不断扩大和集约化程度的不断提高,养殖环境却不断恶化:水体中的各种有机污染物大量积累,病原微生物滋生,病害频发,水体富营养化严重。这不仅制约了水产养殖业的健康发展,也对养殖环境及周边环境造成极大危害。因此,改善养殖环境、控制病害的发生和流行已成为当务之急。

水产养殖环境中,微生物扮演了极其重要的角色。一方面它们能降低水体中的氨、亚硝酸、硫化氢等有害物质的含量,加快有机物分解,促进藻类繁殖,加快水体净化速度^[1];另一方面,水产养殖环境中也存在许多病原微生物,如引起水产动物的细菌性败血症的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、耶尔森氏菌(*Yersinia* Loghem)、草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)、真菌等。一旦病原菌成为优势菌,将会导致严重的病害问题,给水产养殖业造成不可估量的经济损失。因此,对养殖环境中的微生物菌群进行识别和监测,研究环境中各类微生物菌群的生理生态特征,对于水产养殖业的健康发展及养殖环境的保护、修复都具有重要意义。

本文从技术角度对现代微生物分子识别技术进行了概括介绍,并综述了这些技术在水产养殖环境中的应用进展,旨在为水产养殖环境的改善及其病害防治提供参考。

1 现代微生物识别技术

1.1 以核酸为靶分子的识别技术

核酸是生物体中的遗传物质,不同微生物的核酸都有其特异性序列,因此,以微生物核酸中的这些特异性序列为靶目标,构建与其互补的核酸探针,利用碱基互补配对的分子杂交技术,来检测待测样品中是否含有相应微生物的特异性序列,从而完成对该微生物的检出。核酸分子杂

交的高度特异性及检测方法的灵敏性,使该技术得到了快速发展,目前已在此基础上开发出了16S rRNA、基因芯片、原位杂交、LAMP和宏基因组等技术,并在水域环境领域得到广泛应用。

1.1.1 16S rRNA 技术:16S rRNA技术起源于20世纪60年代,Woese C R在研究系统发育时,采用寡核苷酸编目法,花了10年时间比较出各类生物的rRNA特征序列,最终认为16S rRNA及其类似的rRNA基因序列作为系统发育指标最为合适^[2]。16S rRNA序列分析技术的基本原理是针对微生物样本中16S rRNA的基因片段,通过引物设计、基因克隆、测序或酶切、探针杂交,获得16S rRNA序列信息,再与16S rRNA数据库中的序列数据或其它数据进行比较,确定其在进化树种的位置,从而确定样本中可能存在的微生物种类^[3]。随着16S rRNA检测技术越来越成熟,其准确性得到了大家的广泛认可,但在采用16S rRNA进行微生物检测时,有几个问题也值得注意:①提取的总DNA要能代表样品中的遗传多样性;有研究证明采用不同的DNA提取方法和使用不同的通用引物,其结果分析有较大差异^[4];②要克服PCR中由于核酸污染导致的假阳性、基因组DNA PCR不均等扩增现象以及PCR产物中的嵌合序列等问题;③避免探针杂交种出现的假阴性结果^[5];④对16S rRNA数据库依赖性强,16S rRNA数据库也需要进一步的完善,且对鉴定相似的细菌有一定困难。

1.1.2 基因芯片技术:基因芯片技术,是20世纪90年代初发展起来的一种新的分子生物学技术,其原理是将大量靶基因片段有序地、高密度地固定在玻片、硅等载体上,让其与互补的靶核苷酸序列杂交,随后通过对杂交信号的检测分析,可以获得大量的信息。该技术具有高通量、快速、特异性强、灵敏度高、易于自动化生产等特点,经过20年的快速发展,目前已经从模糊走向精准。

不过在其发展过程中, 依然存在较多要克服的困难: ①要实现芯片技术实验结果的可重复性具有一定的困难, 其中技术原因包括芯片载体、点样仪、点样点大小以及合成的寡核苷酸链质量等方面的差异; ②荧光法检测和分析, 重复性较好, 但灵敏度仍然不高; ③缺乏统一、灵敏的分析系统, 使许多试验结果还不能被完整地解释; ④无法克服保守的同源序列对杂交信息的干扰, 存在一定的假阳性, 使其可信度受到质疑; ⑤成本过高等, 这些都是在今后的研究中亟待解决的问题^[6]。

1.1.3 宏基因组技术: 在微生物学研究领域中, 因为 99% 以上的微生物都是目前未(或难)被纯培养的, 过去人们对微生物世界的认识基本上都集中在不到 1% 的微生物上^[7]。早在 1978 年, Torsvik 等^[8]提出了关于宏基因组的研究。在 1991 年, Pace 等^[9]研究海洋微小浮游生物时, 初步证实了从环境中克隆生物体基因的可行性, 并将这种方法称为 Collective Genomes。1996 年, Stein 等通过构建海水中原核微生物基因组文库筛选到了 1 个含有以前从未培养过的古菌 16S rRNA 基因的克隆, 确立了基因组学在微生物学研究中的特殊地位。1998 年, Handelsman 等正式提出“Metagenome”(宏基因组)并创立“Metagenomics”(宏基因组学), 宏基因组定义为“The genomes of the total microbiota found in nature”, 即生境中全部微小生物遗传物质的总和。后来, 宏基因组是指特定环境全部生物遗传物质的总和, 决定着生物群体的生命现象^[10]。宏基因组学研究方法避开了常规微生物研究中的培养过程, 最大限度得保留了样品中微生物中群落的数量和种类^[11]。利用宏基因组技术分析环境中的微生物基因组, 其研究过程可简单地分为 3 步: ①宏基因组的提取: 从环境样品中提取总 DNA; ②宏基因组文库的构建: 将提取的 DNA 片段连接到合适的载体上, 转化宿主菌, 形成一个重组 DNA 文库; ③目的基因的筛选: 获得

的克隆可以根据宿主细菌获得的功能进行筛选, 也可以用已知的探针分离目的基因片段, 从而获得产物。宏基因组技术不但可以研究水环境中的生物多样性, 还可以整体分析水体微生物群落的构成和功能, 这一优势是其他技术无法比拟的。目前已经出现了专门的水体宏基因组学, 很多学者已经利用宏基因组技术研究海洋、湖泊和各大养殖水体。宏基因组技术作为一项极具应用前景的新技术, 依然还有许多技术难点亟待解决, 如大片段高纯度的 DNA 的获得, 表达宿主、载体及高通量的克隆筛选方法是影响整个技术发展和应用的关键问题。

1.1.4 原位杂交技术: 原位杂交技术(In situ hybridization, ISH), 始于 20 世纪 60 年代, 是一门新兴的分子细胞遗传学技术, 美国耶鲁大学的 Gall 等(1969)首先用爪蟾核糖体基因探针与其卵母细胞杂交, 将该基因进行定位, 与此同时 Buongiorno-Nardelli 和 Amaldi 等(1970)相继利用同位素标记核酸探针进行了细胞或组织的基因定位, 从而创造了原位杂交技术^[12]。ISH 的基本原理是用已知的标记单链核酸为探针, 按照碱基互补的原则, 将有放射性或非放射性的外源核酸(即探针)与组织、细胞或染色体上待测 DNA 或 RNA 互补配对, 结合成专一的核酸杂交分子, 经一定的检测手段将待测核酸在组织、细胞或染色体上的位置显示出来。原位杂交所使用的放射性探针, 因其灵敏度高, 对样品要求不太严格, 在原位杂交技术出现的早期使用, 但是由于其检测时间长、分辨率低、且污染环境和对人体有害, 发展后期渐渐被荧光素、生物素、地高辛标等标记的非放射性标记物代替。非放射性标记系统更全、方便、节省时间, 尤其是地高辛标记系统, 目前已被广泛应用。

1.1.5 LAMP 技术: 环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

是一种新型核酸扩增技术,由日本学者 Notomi 等于 2000 年提出。该技术针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异引物,分别为内引物 FIP 和 BIP、外引物 F3 和 B3,利用一种链置换 DNA 聚合酶 (*Bst* DNA polymerase)在恒温条件(60 °C–65 °C)催化新链合成,一个小时内将目的 DNA 从几个拷贝扩增到 10^9 – 10^{10} 个拷贝。LAMP 扩增之后,可以通过琼脂糖电泳后染色观察、直接在产物中加入 SYBR Green I 染色,呈现绿色为阳性反应,橙红色为阴性反应,或者也可以通过扩增副产物焦磷酸镁沉淀的浊度进行判断,液体浑浊,离心或有白色沉淀的为阳性反应,无此现象的则为阴性反应^[13]。由此可以看出 LAMP 技术具有简单、快速、特异性强、扩增效率高等优点,使其在微生物检测方面具有不可比拟的优势,但是 LAMP 有时候也会产生假阳性,需要与其他技术(如探针杂交、酶切鉴定等)联合使用,以确保其准确性。

1.2 基于微生物表面特异性位点的识别技术

这类技术主要是利用一些特殊识别分子来识别微生物表面的一些特异性结构,从而达到识别相应微生物的目的。目前,这类识别技术主要包括两大类,一个是常见的以抗原抗体反应为基础的技术,主要包括单克隆抗体和 ELISA 技术,另一个是以“核酸抗体”著称的适配子或适体为基础的识别技术。下面分别对两类技术进行介绍。

1.2.1 以抗原抗体反应为基础的认识技术: 抗原与抗体之间反应的高度特异性,使其在微生物的识别检测方面得到了广泛的应用,目前基于此原理已开发出了单克隆抗体、ELISA 等多种技术,在水产养殖环境的研究中得到广泛应用。

(1) 单克隆抗体技术

单克隆抗体是由抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合而成的杂交瘤细胞产生的高纯度、高特异性的抗体。19 世纪 70 年代, Kohler 和 Milstein 在细胞融合技术的基础上,首次成功的制备了能永久

分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,从而创立了这项具有划时代意义的单克隆抗体技术^[14]。19 世纪 80 年代,单克隆抗体首次应用于人体治疗。20 世纪 80 年代以后 DNA 重组技术开始应用于抗体的改造,出现了各种各样的基因工程抗体,80 年代末到 90 年代初期,出现了抗体库技术,人们可以不经免疫而制备人源抗体^[15]。单克隆抗体具有高特异性、高纯度、较好的均质性、稳定的亲和力以及重复性好、效价高、成本低、可大量生产等优点,自建立以来,在病原的鉴定方面得到广泛应用。

(2) ELISA 技术

Engvall 和 Pearlman^[16]于 1972 年建立了 ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay) 技术,它是以前抗原抗体特异性反应为基础,将抗体技术与酶联免疫检测技术相结合的一个用于测定抗原抗体的技术。随后,为提高其敏感性和特异性,先后发展出了 CARD-ELISA、BA-ELISA、PCR-ELISA 等延伸技术,目前已成为一项应用最广泛最成熟的免疫化学技术。其主要原理是: 抗原或抗体能吸附至固相载体的表面并保持其免疫活性,酶标记后的固定化的抗原或抗体则既具有免疫活性,又具有反应原性,在测定时,将待检样品与固相载体表面的抗原或抗体发生反应,会形成抗原抗体的复合物,洗涤之后,再加入酶标记的相应的抗原或者抗体,通过特异性反应,同样会结合在固相载体上,那么固相载体上的酶量则是与待测物质成一定比例关系的,加入酶相应的底物以后,酶将底物催化成有色产物,产物的量同样与待测物质的量成比例关系,从而可以根据反应后颜色的深浅进行定性或定量测定。ELISA 技术具有操作简单快速、反应灵敏、特异性强等优点,但该技术也存在一些缺陷,如对于结构相似的化合物存在交叉反应、很难同时分析多种成分,在样品的纯化步骤和灵敏度方面,也

还有待进一步完善。

1.2.2 SELEX 技术: 指数级富集配体的系统进化技术^[17] (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 是 20 世纪 90 年代发展起来并得到广泛应用的一种新的化学组合技术。它应用大容量的随机寡核苷酸文库(包括随机 ssDNA 文库和随机 RNA 文库), 用约 10^{13} – 10^{16} 个随机寡核苷酸序列与靶分子共同孵育, 并通过各种分离途径将结合复合物与未结合序列分离, 洗脱获得与靶分子结合的序列, 并对这些序列进行聚合酶链式反应(PCR)扩增生成次级文库用于下轮筛选, 经过几轮或者数十轮筛选过程, 获得能与靶分子高特异性结合的寡核苷酸序列——适配子(Aptamer)。适配子拥有“核酸抗体”之称, 与抗体蛋白相比, SELEX 技术筛选出的适配子, 具有靶分子范围广、亲和力高、特异性强、稳定性好、易制备修饰、可调控等多种优点, 在人类病原微生物检测方面得到了广泛的应用^[18], 但是在水产病原微生物检测中的应用目前还处于起步阶段。

2 现代微生物识别技术在水产养殖环境研究中的应用

2.1 检测水产养殖环境中的病原微生物

现代微生物识别技术在水产养殖环境研究中发挥了重要的作用, 尤其是在水产病原微生物的检测方面做出了巨大贡献。表 1 总结了这些识别技术对水产养殖环境中病原微生物的检测, 从中可看出, 不同识别技术各有自己的优势和劣势, 其应用范围也有差异, 即使对于同一种微生物, 不同识别技术在灵敏度、准确度和检测成本等方面也不尽相同。如池信才等^[19]制备了副溶血弧菌的单克隆抗体, 并建立了检测副溶血弧菌的双抗体夹心 ELISA 法, 利用其方法对副溶血弧菌的最小检出量为 5×10^4 个/mL, 阳性检出率为 78.5%;

丁文超^[20]使用 LAMP 技术对溶藻弧菌和鳗弧菌进行检测时, 其对溶藻弧菌 OMPK 基因的灵敏度高达 $n(\text{cell})=38$ 个/mL, 对鳗弧菌检测的最低模板浓度达 7.7 CFU/mL, 经验证明皆比常规 PCR 检测的最低模板浓度高一个数量级; 李晨等^[21]建立了鳗弧菌的简型基因芯片, 并对鳗弧菌的 *tox R* 基因的检测阈值是 1.254 pg, 即 3×10^2 拷贝。

总之, 每个技术都有其优势和缺陷, 实际应用时, 必须根据当时当地的实际条件来进行选择。

2.2 研究微生物群落结构及其功能

现代微生物识别技术不仅可用于水产养殖环境中微生物个体的检测, 在水域环境微生物的群落研究方面也发挥着重要作用, 尤其是 16S rRNA 技术、以及以其为基础发展起来的宏基因组技术。Li 等^[37]采用 16S rRNA 技术, 采用 DGGE 方法对虾池和海参养殖环境微生物多样性的进行了研究, 发现单养虾和单养海参的水环境中的微生物多态性明显低于二者混养的水环境。李会琴等^[38]将宏基因组技术用于对虾养殖水环境中, 构建了对虾养殖水环境的 Fosmid 文库, 初步获取了对虾养殖生态系统的微生物遗传信息, 为筛选和鉴定有益生功能的微生物奠定了较好的基础。

近年来, 又出现了一种将芯片技术和宏基因组技术结合起来的新技术——宏基因组芯片技术。Sebat 等^[39]将这种高通量文库筛选技术应用到地下水样的分析, 成功建立了地下水样的宏基因组芯片, 大大缩减了工作量。因此, 加强宏基因组技术与其它技术和学科的交叉融合, 将是未来的一个发展的方向。

此外, 荧光原位杂交技术(FISH)在环境微生物的多样性分析方面也有所报道。Sonja Oberbeckmann 等^[40]利用弧菌的特异性保守基因 *rpoB*, 采用 ERIC-PCR 和 FISH 探针技术对水体中弧菌的群体多样性进行了分析, 发现海湾中的弧菌具有季节性趋势, 每年的 8 月弧菌数量最大, 而 5

表 1 各种微生物识别技术对水产养殖环境中微生物的检测

Table 1 Various microorganism recognition technologies in detection of microorganisms in aquaculture

识别技术 Recognition technology	检测的微生物 Microorganisms for detection	优缺点 Advantages and disadvantages
16S rRNA	鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>)、哈维氏弧菌(<i>Vibrio harveyi</i>)、链球菌(<i>Streptococcus</i>)、气单胞菌(<i>Aeromonas</i>) ^[22] 等。	准确度较高, 定性鉴定较好, 但定量检测较少见, 且对相似菌的鉴别有一定难度。
基因芯片 Gene chip	虹彩病毒(GIV)、流行性造血器官坏死症病毒(EHNV)、病毒性神经坏死病毒(VNNV)、传染性造血器官坏死症病毒(IHNV)、白斑综合症病毒(WSSV)、传染性皮下和造血器官坏死病毒(IHHNV)、肝胰腺细小病毒(HPV); 镰刀菌(<i>Fusarium</i>)、丝囊霉菌(<i>Aphanomyces piscicida</i>)、变形藻丝囊菌(<i>Aphanomyces astaci</i>)等 ^[23] ; 鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>)、嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)及迟缓爱德华氏菌(<i>Edwardsiella tarda</i>)等 ^[24]	检测种类多, 高通量, 但费用高。
原位杂交 In situ hybridization	斑马鱼传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、石斑鱼虹彩病毒(SGIV)、人工感染传染性肌肉坏死病毒(IMNV)、黄头病毒(YHV)、胰脏坏死症病毒(IPNV)、牡蛎疱疹病毒 ^[25] 等几十种	在水产中主要用于基因定位和病毒检测; 但实验周期较长, 步骤繁琐。
LAMP	鲁氏耶尔森氏菌(<i>Yersinia ruckeri</i>) ^[26] 、爱德华氏菌(<i>Edwardsiella tarda</i>)、弧菌(<i>Vibrio</i>)、诺卡氏菌(<i>Nocardia seriolae</i>)、柱状黄杆菌(<i>Flavobacterium columnare</i>)、白斑综合症病毒(WSSV)、疱疹病毒(KHV)、虹彩病毒(SGIV)、传染性造血器官坏死病毒(IHNV)、黄头病毒(YHV)、桃拉综合征病毒(TSV)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV) ^[27] 等三十多种	简单、快速、扩增效率高; 但是引物设计非常复杂
单克隆抗体 Monoclonal antibody	气单胞菌(<i>Aeromonas</i>)和鲁氏耶尔森氏菌(<i>Yersinia</i>) ^[28] 、鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>) ^[29] ; 传染性胰坏死病毒(IPNV), 传染性造血器官坏死病毒(IHNV), 鲑鱼传染性贫血症病毒(ISA), 病毒性出血性(VHSV), 蛇头鱼弹状病毒(FRV), 草鱼呼肠弧病毒(GCHV), 真鲷虹彩病毒(RSIV), 鲤春病毒血症病毒(SVCV) ^[30]	纯度好、灵敏度较高、特异性强、易于大批量生产; 但只针对1种抗原决定簇, 比较单一。
ELISA	弧菌(<i>Vibrio</i>)、栉孔扇贝的急性病毒性坏死症病毒(AVND)、中国对虾白斑综合症病毒(WSSV) ^[31] 、柱状黄杆菌(<i>Flavobacterium columnare</i>) ^[32] 、迟缓爱德华氏菌(<i>Edwardsiella tarda</i>) ^[33] 、牙鲆淋巴囊肿病毒(LCDV) ^[34] 、罗氏沼虾诺达病毒(MrNV) ^[35] 、嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)、流行性造血器官坏死病(EHNV)等	特异性强、敏感性高、检测时间短; 对检测对象要求高。
SELEX	溶藻弧菌(<i>Vibrio alginolyticus</i>) ^[36]	靶分子范围广、亲和力高、在水产中的应用尚处起步阶段。

月几乎检测不到弧菌, 并建立了相应的趋势预测模型, 此研究为相应疾病的预防和控制奠定了较好的基础。

3 未来发展方向

尽管微生物识别技术在水产养殖环境的研究

中发挥了重要作用, 但是目前各种识别技术大多还是以定性为主, 能用于定量的技术并不多, 尤其是用于微生物群落研究的宏基因组技术, 目前大都是以微生物鉴定及其多样性的定性研究为主, 几乎没有相关定量研究的报道。这一方面是因为环境中的微生物能够被纯培养的较少, 另一

方面也是因为目前的定量技术难以对复杂环境条件下未知微生物进行有效检测。因此, 开发新的定量技术, 拓展以 ELISA 技术、芯片技术以及荧光定量 PCR 等定量技术的应用范围, 将是今后的一个发展方向。

此外, 微生物的生态系统是目前的水产养殖环境研究中比较活跃的领域, 但目前的研究大多集中于较基础的多样性分析, 而有关水产养殖环境中微生物群落的动态变化、数量变动规律、微生物对养殖品种的作用方式、微生物种群间和种群内的相互影响目前还缺乏较系统、完整的研究, 因此, 进一步深化水产养殖环境中微生物的生态系统研究, 对于养殖环境的修复、水产业的健康发展都具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 王京伟. 微生物对养殖水体水质调控作用的研究[D]. 太原: 山西大学硕士学位论文, 2007.
- [2] Zablen L, Woese CR. Prokaryote phylogeny IV: concerning the phylogenetic status of a photosynthetic bacterium[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1975, 5(1): 25-34.
- [3] Schleifer KH, Ludwig W, Amann RI. Ribosomal ribonucleic acid sequence analysis and hybridization technology in the identification of microorganisms[J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1992, 343(1): 47.
- [4] Luo P, Hu CQ, Zhang LP, et al. Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rRNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming waters[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2007, 25(3): 310-316.
- [5] 周煜. 16S rRNA 序列分析法在医学微生物鉴定中的应用[J]. *生物技术通报*, 1999, 10(4): 297-305.
- [6] 李晨, 黄健. 细菌检测基因芯片的简述及其在水产上的应用[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(4): 41-44.
- [7] Kellenberger E. Exploring the unknown-the silent revolution of microbiology[J]. *European Molecular Biology Organization Reports*, 2001, 2(1): 5-7.
- [8] Torsvik VL, Goksoyr J. Determination of bacterial DNA in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1978, 10(1): 7-12.
- [9] Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(14): 4371-4378.
- [10] 马莉莉, 宗浩, 宋培勇. 宏基因组学-研究环境微生物的钥匙[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(20): 9377-9379.
- [11] Sreit WR, Schmitz RA. Metagenomics-the key to the uncultured microbes[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(5): 492-498.
- [12] 何玉英, 李健, 刘萍, 等. 原位杂交技术及其在水产养殖中的应用[J]. *海洋与水产研究*, 2005, 26(1): 74-79.
- [13] 李志强. LAMP 技术在微生物检测中的应用[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(8): 3-6.
- [14] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [15] 汪开毓, 黄艺丹, 黄小丽, 等. 单克隆抗体 (*Monoclonal antibodies*) 技术在水生动物疾病上的研究进展[J]. *现代渔业信息*, 2008, 23(9): 3-8.
- [16] Engvall E, Perlman P. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes[J]. *Journal of Immunology*, 1972, 109(1): 129-135.
- [17] Guo L. Recent advances in SELEX and applications of aptamers[J]. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2010, 7(4): 249-256.
- [18] 府伟灵, 姚春艳. SELEX 技术在微生物检测中的应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15(4): 361-362.
- [19] 池信才, 王军, 鄢庆彬, 等. 大黄鱼病原副溶血弧菌单克隆抗体制备及其应用[J]. *海洋科学*, 2007, 31(8): 1-5.

- [20] 丁文超. 几种水产养殖动物病原快速检测方法的研究[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2009.
- [21] 李晨, 黄健, 谢国骊, 等. 3种水产病原菌简型基因芯片检测技术的建立[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2011, 41(3): 37-42.
- [22] 仲禾, 刘星, 高祥刚, 等. 16S rRNA 检测技术及其在水产增殖中的应用[J]. 水产科学, 2009, 28(4): 229-233.
- [23] 荆晓艳. 海水养殖动物部分病原检测基因芯片的初步设计[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2009.
- [24] 李晨, 黄健. 细菌检测基因芯片的简述及其在水产上的应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(4): 41-44.
- [25] 蔡玉勇, 任伟成, 王崇明, 等. 原位杂交技术及其在水产养殖动物病毒性疾病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(3): 71-73.
- [26] Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish[J]. BMC Veterinary Research, 2008, 4(1): 31-40.
- [27] 丁文超. 几种水产养殖动物病原快速检测方法的研究[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2009: 11.
- [28] Austin B, Bishop I, Gray C, et al. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms[J]. Journal of Fish Diseases, 1986, 9(5): 469-474.
- [29] 樊海平, 吴斌, 曾占壮, 等. 日本鳎体表溃疡病原菌的分离、鉴定及单克隆抗体制备[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 295-302.
- [30] 姜有声, 战文斌, 程顺峰, 等. 对虾白斑综合征病毒囊膜蛋白 VP19的单克隆抗体制备及其定位[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 69-74.
- [31] 李国, 闫茂仓, 常维山, 等. 文蛤副溶血弧菌间接 ELISA 检测技术的研究[J]. 海洋通报, 2008, 27(5): 85-90.
- [32] 夏君, 吴志新, 张鹏, 等. 柱状黄杆菌间接 ELISA 快速检测方法的研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(2): 65-70.
- [33] 白方方, 兰建新, 王燕, 等. 迟缓爱德华氏菌间接 ELISA 快速检测法[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 619-624.
- [34] 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.
- [35] 钱冬, 刘问, 潘晓艺, 等. 罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测法的建立及应用研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(4): 377-382.
- [36] Zheng J, Li T, Wang J, et al. *In vitro* selection of aptamer to pathogenic vibrio by Selex[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136: 751-759.
- [37] Li QF, Zhang Y, Juck D, et al. Phylogenetic analysis of bacterial communities in the shrimp and sea cucumber aquaculture environment in northern China by culturing and PCR-DGGE[J]. Aquaculture International, 2010, 18(6): 977-990.
- [38] 李会琴, 林炜铁, 蔡小龙, 等. 对虾养殖水环境宏基因组 Fosmid 文库的构建[J]. 生物技术通报, 2011(6): 112-115.
- [39] Sebat JL, Colwell FS, Crawford RL. Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4927-4934.
- [40] Sonja O, Antje W, Karen HW, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 100(2): 291-307.