

# 基于 *lolB* 基因的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测病原霍乱弧菌方法的建立

张晓君 姚东瑞 阎斌伦 秦蕾 毕可然 梁利国

(淮海工学院海洋学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 连云港 222005)

**摘要** 基于霍乱弧菌 *lolB* 基因保守序列设计 1 对特异性引物, 建立了 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测霍乱弧菌的方法。常规 PCR 检测仅霍乱弧菌扩增出大小为 519bp 的目的片段, 其他 3 种病原弧菌均为阴性; SYBR Green I 实时定量 PCR, 在  $T_m$  为 86.5~87 °C, 扩增产物的熔解曲线只出现 1 个单特异峰, 无引物二聚体, 表明该引物具有较好的特异性。SYBR Green I 实时定量 PCR 扩增曲线反映了 PCR 的指数增长阶段和平台阶段; 所制作的标准曲线在  $2.59 \times 10^8 \sim 2.59 \times 10^0$  拷贝数之间有较好的线性关系, 相关系数为 0.993, 能对霍乱弧菌进行准确的定量分析。该方法检测时间从核酸抽提到结果分析仅需 4~5 h, 较传统方法敏感、操作简单、耗时短, 是霍乱弧菌引起的水产动物疾病的快速诊断及流行病学调查的有效方法。

**关键词** 霍乱弧菌 *lolB* 基因 SYBR Green I Real-time PCR

**中图分类号** 0657.79 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)02-0104-07

## Development of a SYBR Green I real-time PCR for detection of *Vibrio cholerae* based on *lolB* gene

ZHANG Xiao-jun YAO Dong-rui YAN Bin-lun  
QIN Lei BI Ke-ran LIANG Li-guo

(Key Laboratory of Oceanic Biotechnology of Jiangsu, College of Ocean, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang, 222005)

**ABSTRACT** The *lolB* gene has been shown to code an outer membrane lipoprotein, and serve as a reliable molecular marker for the detection of all *V. cholerae* serogroup and biotypes. A pair of specific primers based on *lolB* gene of *V. cholerae* were designed, and a real-time PCR using SYBR Green I for *V. cholerae* detection was established. A 519bp gene fragment was amplified from chromosomal DNA of *V. cholerae*, and no positive reaction was detected in 3 other pathogenic *Vibrio* species using conventional PCR. The melting curve analysis of SYBR Green I real-time PCR showed one specific peak with melting temperature ( $T_m$ ) of 86.5~87 °C, and no primer-dimers peak present. The results indicated that the PCR primers have good specificity. Amplification curves of SYBR Green I real-time PCR revealed the geometric phase and plat-

eau phase of PCR. Analysis of standard curves revealed excellent correlation between the quantity of bacteria ( $2.59 \times 10^8$  to  $2.59 \times 10^0$ ) and PCR threshold cycle (Ct), with the correlation rate of 0.993. The results indicated that the SYBR Green I real-time PCR could be used as an effective assay for quantification of pathogenic *V. cholerae*. The assay could be completed within 4~5 h from extraction of nucleic acids to analysis of results. The SYBR Green I real-time PCR was a simple, rapid, specific and sensitive method for the diagnosis of aquatic animal diseases and investigation of epidemics caused by *V. cholerae*.

**KEY WORDS** *Vibrio cholerae* *lolB* gene SYBR Green I Real-time PCR

霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 是引起人霍乱 Cholera 的病原菌,该菌广泛分布于水环境,已知有不少血清型株(非 O1 群)能引起水产动物感染发病(王立平等 1997;杨鸢劫等 2006;Kiiyukia *et al.* 1992;Muroga *et al.* 1979;Reddacliff *et al.* 1993),被认为是一种人与水产养殖动物共染的病原菌。近年来,由于出口创汇,泥鳅人工集约化养殖迅速发展,尤其是在苏北地区已形成了大规模养殖,但随之而来的病害问题已严重制约了泥鳅养殖业的发展,尤其是养殖泥鳅发生的以体表出血及皮肤溃疡为特征的严重疾病,可造成养殖泥鳅的大批死亡,经细菌学研究表明为霍乱弧菌感染(邴旭文等 2009)。为满足泥鳅养殖生产对该菌快速诊断要求及泥鳅出口的检疫检测,选择合适的分子靶标,研究开发灵敏度高、特异性强的病原霍乱弧菌快速检测方法已十分重要,使鱼体处于带菌状态或大规模暴发霍乱弧菌引起的疾病之前能进行准确的检测,尤其是建立核酸分子检测技术可进一步提高其准确性、快速性和特异性,将为霍乱弧菌引起的疾病的快速诊断、监测及分子流行病学调查等奠定良好的基础。

霍乱弧菌传统的细菌学检验方法需经富集培养、形态特征观察、生理生化反应、血清学鉴定等过程,耗时长。随着分子生物学技术的不断发展,应用单一和多重 PCR 技术检测霍乱弧菌 *ctx* (Cholera toxin)、*zot* (Zonula occludens toxin)、*tcp* (Toxin-coregulated pilus)、*rtx* (Repeat in toxin) 和 *hly* (Hemolysin) 等毒力基因的分子生物学检验方法已多有报道(Fields *et al.* 1992;Koch *et al.* 1993;Rivera *et al.* 2001;Singh *et al.* 2002;Varela *et al.* 1994),但这些方法不能检测不具备上述毒力基因的 non-O1/non-O139 型菌株,而这些菌株仍能导致散发的或局部流行的霍乱样腹泻的发生(Kaper *et al.* 1995;Vital Brazil *et al.* 2002),而 *lolB* 是一编码外膜脂蛋白基因(Matsuyama *et al.* 1997),该基因能够检测所有霍乱弧菌生物型菌株(O1、O139 和 non-O1/non-O139)(Lalitha *et al.* 2008)。本研究以 *lolB* 基因为靶基因,建立了 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测霍乱弧菌的方法,通过实验证实该方法特异性强、灵敏度高、检测耗时短,是定量检测霍乱弧菌所有生物型菌株的有效方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株来源及引物设计

供试霍乱弧菌分离自江苏连云港赣榆县发病泥鳅,已通过表型及分子鉴定(邴旭文等 2009),阴性对照鳊弧菌 *V. anguillarum*、哈氏弧菌 *V. harveyi* 及副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus* 均为本实验室分离鉴定并保存。

GenBank 上获得霍乱弧菌及其他肠道细菌的 *lolB* 基因的 DNA 序列,采用 Clustal W 软件进行同源性分析,确定在霍乱弧菌菌株内保守、其他菌株间特异的区段,利用生物软件 Primer 5.0 设计霍乱弧菌的特异性检测引物:vc-*lolB*-F:5'-tgg gag cag cgt cca ttg tg-3';vc-*lolB*-R:5'-caa tca cac caa gtc act c-3'。由上海生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 细菌模板 DNA 的提取及引物特异性检测

供试菌模板 DNA 按上海赛百盛基因技术有限公司生产的小量细菌基因组 DNA 抽提试剂盒所述方法及

水煮法提取。以 *vc-lolB-F* 和 *vc-lolB-R* 为引物进行常规 PCR 扩增,检测引物特异性。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 3 min,接着 94 °C 变性 1 min、58 °C 复性 1 min、72 °C 延伸 1 min,30 个循环,然后 72 °C 温育 7 min;在 20 $\mu$ l 反应体系中含有:双蒸水 13.4  $\mu$ l,10 $\times$ PCR 缓冲液 2  $\mu$ l,MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.6  $\mu$ l,4 $\times$ dNTP 混合物 0.4  $\mu$ l,引物各 0.2  $\mu$ l,*Taq* DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ l)0.2  $\mu$ l,模板 DNA 2  $\mu$ l。取 5  $\mu$ l 的 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 *lolB* 标准质粒的构建

按 1.2 所述 PCR 反应条件,以 60  $\mu$ l 反应体系扩增霍乱弧菌 *lolB* 基因,琼脂糖凝胶电泳检测后用上海生物工程技术有限公司生产的 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒将阳性 PCR 产物进行胶回收、纯化,将回收纯化的 *lolB* 基因的 PCR 产物,利用大连宝生物公司生产的 pMD18T 载体进行连接,一般连接 3 h,连接完毕后将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布含有 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板进行蓝白斑筛选,随机挑取 15 个白色克隆进行菌液 PCR 鉴定,以确证为阳性克隆。取两个阳性克隆用上海生物工程技术有限公司生产的 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒。用核酸蛋白分析仪测量质粒浓度,根据阿佛加德罗常数换算出每  $\mu$ l 质粒中的 DNA 的拷贝数,作为本研究的标准阳性样本。

### 1.4 霍乱弧菌 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 检测方法的建立

#### 1.4.1 反应体系优化

设立引物浓度梯度为 0.1~0.5  $\mu$ l(10  $\mu$ mol/L),以确定反应的最佳引物浓度;优化退火温度(57~62 °C),利用 Bio-Rad iQ5 Optical System 软件进行数据分析,以得到最小的 Ct 值并且在熔解曲线中不产生非特异性峰为指标。

#### 1.4.2 定量标准曲线的建立

利用构建好的 pMD18-*lolB* 重组质粒作为霍乱弧菌定量标准品,对定量标准品进行 10 倍梯度稀释,共稀释 9 个梯度,利用优化好的荧光 PCR 反应条件检测各梯度标准品的 Ct 值。以质粒拷贝数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标,建立质粒拷贝浓度与 Ct 值对应关系的定量标准曲线。

#### 1.4.3 荧光 RT-PCR 的重复性试验

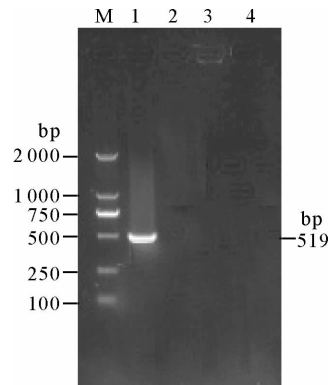
选择构建好的 pMD18-*lolB* 重组质粒稀释的 4 个梯度,进行组内和组间重复性试验。组内重复性试验,每个稀释度设 5 个重复管,计算其组内变异系数;pMD18-*lolB* 重组质粒的 4 个稀释度冰冻保存后,隔天进行组间重复性试验,共复检 3 次,计算其组间变异系数。

#### 1.4.4 荧光 RT-PCR 的敏感性检测

对已知拷贝数的 pMD18-*lolB* 重组质粒进行 10 倍梯度系列稀释,对各稀释度进行荧光 PCR 检测,利用 Bio-Rad iQ5 Optical System 软件进行数据分析,从而确定该方法对靶基因的最低检出限。

### 1.5 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 检测方法的初步应用

购买泥鳅和鲤鱼,人工感染霍乱弧菌后,无菌操作取其肌肉组织进行研磨,研磨液用水煮法提取细菌模板 DNA,按上述方法进行荧光 PCR 检测;通过样品的扩增曲线、Ct 值及熔解曲线进行结果判断。



M. DL2000; 1. 霍乱弧菌; 2~4. 副溶血弧菌、鳃弧菌、哈氏弧菌

M. DL2000; 1. *V. cholerae*; 2~4. *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*

图 1 引物特异性检测结果

Fig. 1 Specificity of primers

## 2 结果

### 2.1 引物特异性检测结果

以 *vc-lolB-F* 和 *vc-lolB-R* 为引物,对霍乱弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌、哈氏弧菌模板 DNA 进行常规 PCR 扩增,结果仅霍乱弧菌扩增出大小为 519bp 的目的基因片段,其他 3 种病原弧菌均为阴性结果。结果表明,该实验所使用的引物具有较强的特异性。

### 2.2 定量标准品的制备

pMD18-*lolB* 基因重组质粒经分光光度计测定,其浓度为 90.1 ng/ $\mu\text{l}$ ,根据阿弗加德罗常数换算出重组质粒的拷贝数为  $2.59 \times 10^{10}$  / $\mu\text{l}$ ,该重组质粒稀释成  $2.59 \times 10^8$  后作为定量标准品原液保存。

### 2.3 反应优化条件

20 $\mu\text{l}$  反应体系包括:双蒸水 8.6 $\mu\text{l}$ ,SYBR Green I Hotstar Fluo-PCR Mix(上海生工生物工程技术有限公司生产) 10 $\mu\text{l}$ ,正、反向引物各 0.2  $\mu\text{l}$ ,1  $\mu\text{l}$  标准阳性质粒;定量 PCR 反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,进行 45 个循环。pMD18-*lolB* 基因重组质粒在  $2.59 \times 10^8 \sim 2.59 \times 10^0$  拷贝数范围的定量 PCR,其扩增曲线反映了 PCR 的指数增长阶段和平台阶段(图 2)。

### 2.4 标准曲线

利用优化好的霍乱弧菌 RT-PCR 反应体系对 9 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行检测,建立质粒拷贝浓度的对数值与 Ct 值对应关系的定量标准曲线(图 3)。实验结果显示,所制作的标准曲线在  $2.59 \times 10^8 \sim 2.59 \times 10^0$  拷贝数之间的 Ct 相差比较均匀,符合定量 PCR 的 Ct 值与起始拷贝数之间的线性关系。相关系数为 0.993,斜率约为 -3.315,截距为 35.462,得出细菌拷贝数与 Ct 值的线性方程为: $Ct = -3.315X + 35.462$ 。在对样品进行检测时,根据其 Ct 值和线性方程可以获得该样品 DNA 拷贝数。

### 2.5 荧光定量 PCR 的溶解曲线

利用优化好的霍乱弧菌 RT-PCR 反应体系对 9 个 10 倍梯度稀释的 pMD18-*lolB* 基因重组质粒进行检测,实验结果显示,熔解曲线均只有 1 个熔解峰, $T_m$  值为 86.5~87  $^{\circ}\text{C}$ ,表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体(图 4)。

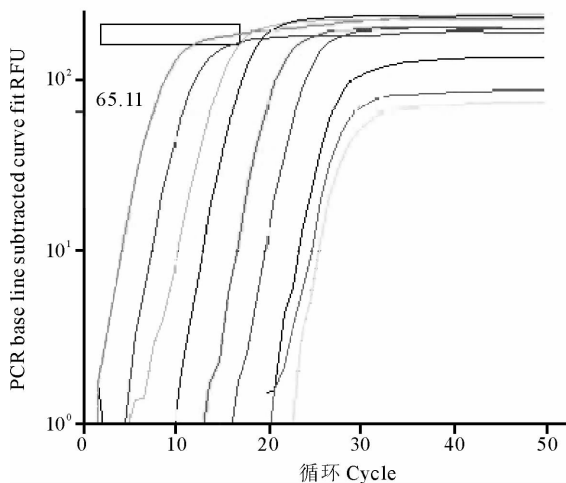


图 2 SYBR Green I real-time PCR 扩增曲线

Fig. 2 Amplification curves of SYBR Green I real-time PCR

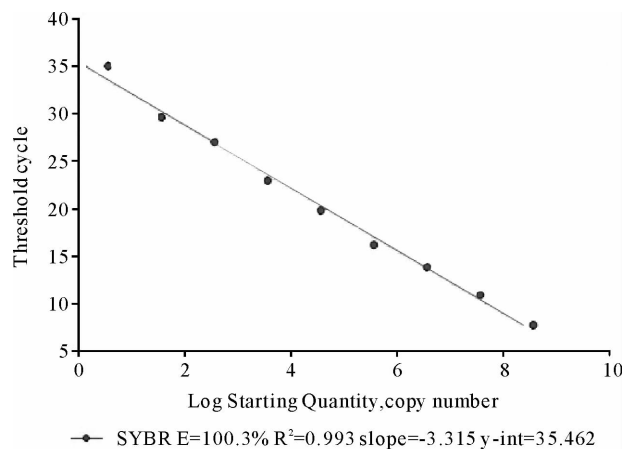


图 3 SYBR Green I real-time PCR 的标准曲线

Fig. 3 Standard curves of SYBR Green I real-time PCR

## 2.6 荧光 RT-PCR 的重复性分析

将构建好的 pMD18-*lolB* 重组质粒稀释成每  $\mu\text{l}$  的拷贝数为  $2.59 \times 10^6$ 、 $2.59 \times 10^5$ 、 $2.59 \times 10^4$ 、 $2.59 \times 10^3$  的 4 个梯度,进行每个梯度设 5 个重复管的组内荧光 RT-PCR 试验,其 Ct 值及组内变异系数见表 1; 3 次组间重复性试验,其 Ct 值及组间变异系数见表 2。荧光 RT-PCR 的组内变异系数为 2.07%~3.72%,组间变异系数为 0.97%~2.77%,结果表明该方法具有良好的重复性。

## 2.7 荧光 RT-PCR 的灵敏度

重组质粒检测灵敏度表明,用双蒸水将已知拷贝数的 *lolB* 基因重组质粒作 10 倍系列稀释为  $2.59 \times 10^8 \sim 2.59$ ,共 9 个稀释度,取各个稀释度作荧光 PCR 检测确定其最低检出限。结果表明,稀释度  $2.59 \times 10^8 \sim 25.9$ ,均有较强的荧光信号,稀释度为 2.59 时荧光信号较弱,该检测方法至少能检测到 25 个 DNA 拷贝数(图 5),具有较高的灵敏度。

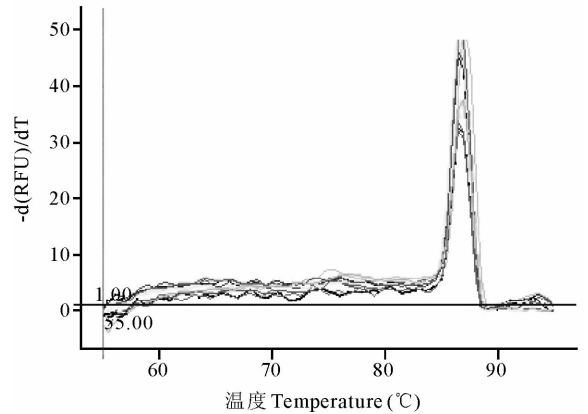


图 4 SYBR Green I real time PCR 溶解曲线

Fig. 4 Melting curves of SYBR Green I real-time PCR

表 1 Ct 值及组内变异系数

Table 1 The Ct and intra-assay coefficient of variations (CVs %)

质粒拷贝数 Plasmid copy number	Ct1	Ct2	Ct3	Ct4	Ct5	Ct 平均 Average	标准差 S. D.	变异系数 CVs(%)
$2.59 \times 10^6$	13.75	14.12	13.67	13.18	14.09	13.76	0.34	2.48
$2.59 \times 10^5$	16.19	16.92	15.83	15.54	16.58	16.21	0.49	3.07
$2.59 \times 10^4$	19.72	20.03	18.94	18.15	19.97	19.36	0.72	3.72
$2.59 \times 10^3$	22.86	23.12	22.73	21.82	23.06	22.72	0.47	2.07

表 2 Ct 值及组间变异系数

Table 2 The Ct and inter-assay coefficient of variations (CVs %)

质粒拷贝数 Plasmid copy number	Ct1	Ct2	Ct3	Ct 平均 Average	标准差 S. D.	变异系数 CVs(%)
$2.59 \times 10^6$	13.85	14.34	13.56	13.92	0.32	2.31
$2.59 \times 10^5$	16.19	17.08	16.05	16.44	0.46	2.77
$2.59 \times 10^4$	19.82	20.12	19.45	19.80	0.27	1.38
$2.59 \times 10^3$	22.96	23.18	22.64	22.93	0.22	0.97

## 2.8 人工感染样品的检测

利用本研究建立的霍乱弧菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 方法,对人工感染的泥鳅和鲤鱼进行检测,PCR 的 Ct 值与 DNA 拷贝数之间的定量曲线见图 6。结果显示,泥鳅样品 Ct 值为 24.63,其 DNA 拷贝数为  $1.85 \times 10^3$ ,鲤鱼样品 Ct 值为 27.88,其 DNA 拷贝数为  $1.931 \times 10^2$ ,两个被检样品均呈阳性反应,实验结果表明,该荧光 PCR 方法具有较好的适用性。

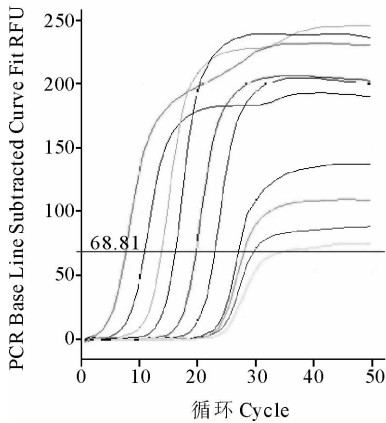


图 5 霍乱弧菌 SYBR Green I real-time PCR 检测灵敏度  
Fig. 5 Sensitivity for detection of *V. cholerae* by SYBR Green I real-time quantitative PCR

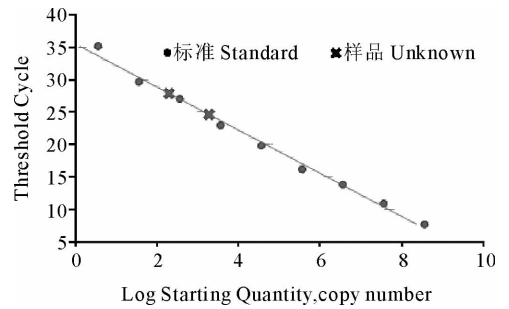


图 6 SYBR Green I real-time PCR 样品检测曲线  
Fig. 6 Detection curves of samples by SYBR Green I real-time PCR

### 3 讨论

SYBR Green I 是一种与双链 DNA 结合发光的荧光染料。与双链 DNA 结合后,其荧光大大增强,且其荧光强度的增加与双链 DNA 的数量成正比,而没有掺入链中的 SYBR Green I 染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。荧光定量 PCR 技术是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累,实时检测整个 PCR 进程,根据荧光信号检测出反应体系中存在的双链 DNA 数量,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。目前,应用 *Taq* Man 探针荧光定量 PCR 技术检测水产动物病原病毒、病原寄生虫及病原细菌的方法已多有记述(刘宗晓等 2008;岳志芹等 2008;谢丽基等 2010;吴绍强等 2009)。本研究建立的霍乱弧菌 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测方法与 *Taq* Man 探针法相比,操作简单,不需要设计、合成昂贵的探针,只需在 SYBR Green I 反应混合液中加入引物和待测样品的 DNA;与普通 RT-PCR 相比,SYBR Green I PCR 扩增完成后,使用 Bio-Rad iQ5 Optical System 软件可以直接对检测结果进行分析,方便且省时,从核酸的提取到定量 PCR 反应完成只需要 4~5 h 的时间,使用 i cycler iQ5 多通道荧光定量 PCR 仪 1 次可以进行 96 个样品的高通量检测,模板浓度范围宽,可以检测到样品中极微量靶分子核酸,灵敏度高且重复性好,尤其是该技术可以进行定量分析。该技术缺点在于需要较昂贵的仪器设备,不适合基层单位和现场应用。

non-O1/non-O139 群霍乱弧菌严重危害水产养殖生产,传统的霍乱弧菌的微生物学检验,主要依赖于细菌培养、对分离菌的理化特性鉴定和血清型检定,不仅操作繁琐,且耗时长。因此,建立一种快速、敏感、特异的检测方法是十分必要的。*lolB* 基因是一编码霍乱弧菌外膜脂蛋白基因,尤其是该基因存在于所有霍乱弧菌生物型菌株(O1、O139 和 non-O1/non-O139),且肠道细菌间种间差异较大,因此该基因适合于由霍乱弧菌引起的水产动物疾病的早期分子诊断,尤其是针对常缺乏 *ctx* 等毒力基因的 non-O1/non-O139 群菌株,该基因是良好的分子靶标。本研究根据 *lolB* 基因作为扩增的靶基因检测霍乱弧菌,普通 PCR 的特异性试验结果表明,引物(vc-*lolB*-F 和 vc-*lolB*-R)仅对所检测的泥鳅病原霍乱弧菌可扩增出大小为 519bp 的基因片段,对水产动物其他病原弧菌(鳃弧菌、哈氏弧菌和副溶血弧菌)的检测均呈阴性反应,同时 pMD18-*lolB* 基因重组质粒及检测样品 SYBR Green I pCR 的熔解曲线均只有 1 个熔解峰,表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体,说明该引物对霍乱弧菌具有良好的特异性。

由于 SYBR Green I 与所有的双链 DNA 相结合,因此由引物二聚体、单链二级结构以及非特异的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。荧光染料法实时定量 PCR 检测的结果分析软件,其熔解曲线功能可以帮助确定 PCR 生成几种产物、有无二聚体,从而得到定量结果。本研究的 pMD18-*lolB* 基因重组质粒及检测样品熔解曲线均只有 1 个熔解峰,  $T_m$  值为 86.5~87 °C,表明反应过程中未出现非特异性扩增和引物二聚体,

该方法用于霍乱弧菌的定量检测是良好的。

## 参 考 文 献

- 王立平, 张晓华, 刘 镁, 段爱梅, 宋晓玲, 徐怀恕. 1997. 中国对虾糠虾幼体病原菌(非 O1 群霍乱弧菌)的研究. 中国水产科学, 4 (1): 45~51
- 刘宗晓, 刘 荭, 史秀杰, 高隆英, 岳志芹, 吕建强, 何俊强, 江育林, 谢从新. 2008. 杀鲑气单胞菌的实时定量 PCR 检测方法的建立和应用. 海洋水产研究, 29(5):83~88
- 邴旭文, 阎斌伦, 张晓君, 秦 蕾, 毕可然. 2009. 泥鳅病原霍乱弧菌的表型与分子鉴定. 海洋与湖沼, 40(6): 692~698
- 吴绍强, 李海艳, 林祥梅, 郑 腾, 李西峰, 刘 建, 梅 琳, 韩雪清, 贾广乐. 2009. 贝类派琴虫实时荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用. 渔业科学进展, 30(5):58~63
- 岳志芹, 刘 荭, 梁成珠, 高宏伟, 徐 彪, 邓明俊, 江育林. 2008. 实时定量 RT-PCR 检测鱼类传染性造血器官坏死病毒方法的建立与应用. 水生生物学报, 32(1):91~95
- 杨鸾劫, 俞菊华, 陈 辉, 方 苹, 郭 闯. 2006. 暗纹东方鲀非 O1 霍乱弧菌的鉴定及毒力基因检测. 水产学报, 30 (4): 525~530
- 谢丽基, 谢芝勋, 庞耀珊, 刘加波, 邓显文, 谢志勤. 2010. 贝类单孢子虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法的建立. 渔业科学进展, 31 (3):77~83
- Fields, P. I., Popovic, T., Wachsmuth, K., and Olsvik, O. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8): 2 118~2 121
- Kaper, J. B., Morris Jr, J. G., and Levine, M. M. 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 48~86
- Kiiyukia, C., Nakajima, A., Nakai, T., Muroga, K., Kawakami, H., and Hashimoto H. 1992. *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9): 3 078~3 082
- Koch, W. H., Payne, W. L., Wentz, B. A., and Cebula, T. A. 1993. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2): 556~560
- Lalitha, P., Siti Suraiya, M. N., Lim, K. L., Lee, S. Y., Nur Haslindawaty, A. R., Chan, Y. Y., Ismail, A., Zainuddin Z., F., and Ravichandran, M. 2008. Analysis of *lolB* gene sequence and its use in the development of a PCR assay for the detection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1): 142~144
- Matsuyama, S., Yokota, N., and Tokuda, H. 1997. A novel outer membrane lipoprotein, *lolB* (HemM), involved in the *lolA* (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 16(23): 6 947~6 955
- Muroga, K., Takahashi, S., and Yamanoi, H. 1979. Non-cholera *Vibrio* isolated from diseased ayu. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 45: 829~834
- Reddacliff, G. L., Hornitsky, M., Carson, J., Fettersen, R., and Zelski, R. 1993. Mortalities of goldfish, *Carassius auratus* (L.), associated with *Vibrio cholera* non-O1. *Journal of Fish Diseases*, 16(6): 517~520
- Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B., and Colwell R. R. 2001. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2 421~2 429
- Singh, D. V., Isac, S. R., and Colwell, R. R. 2002. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11): 4 321~4 324
- Varela, P., Pollevick, G. D., Rivas, M., Chinen, I., Binsztein, N., Frasc, A. C., and Ugalde, R. A. 1994. Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5): 1 246~1 248
- Vital Brazil, J. M., Alves, R. M., Rivera, I. N., Rodrigues, D. P., Karaolis, D. K. R., and Campos, L. C. 2002. Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 1999. *FEMS Microbiology Letters*, 215(1): 15~21