

鸡源鲍氏志贺菌的 RAPD 分析

杨 霞, 陈 陆, 刘红英, 常洪涛, 王川庆

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】确定鸡源鲍氏志贺菌的进化地位。【方法】选用 6 条随机引物(P1~P6),采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术,对 1 株鸡源鲍氏志贺菌、2 株鸡白痢沙门菌、2 株鸡肠致病性大肠杆菌和 2 株痢疾志贺菌共 7 株菌的基因组 DNA 进行分析,同时对个别特殊序列进行克隆测序,并在此基础上分析了鸡源鲍氏志贺菌与其他 15 个相关菌株的进化关系。【结果】6 条随机引物中有 4 条引物(P1,P2,P4 和 P6)能较好地志贺菌、鸡白痢沙门氏菌和鸡致病性大肠杆菌 3 种菌中检测到多态性分子标记;这 4 条有效引物共扩增出了 64 个 DNA 片段,其中 7 个菌株共有的谱带有 3 条,多态性片段有 61 条,多态率达 95.3%。引物 P2 可根据扩增图谱将志贺菌和大肠杆菌与沙门菌鉴别出来;用引物 P6 对上述 7 株细菌进行扩增,发现同种菌株间谱带特别相似,其中鸡鲍氏志贺菌与人痢疾志贺菌扩增条带的相同率达 66.7%,与鸡肠致病性大肠杆菌扩增条带的相同率达 44.4%,而鸡白痢沙门菌与志贺菌的扩增谱带相差甚远,可用于 3 种细菌的鉴别。对扩增片段进行的测序及进化分析结果显示,鸡源鲍氏志贺菌与人源志贺菌的进化距离最近。【结论】鸡源鲍氏志贺菌可能是人源志贺菌的一个变异株或新的亚种。

【关键词】 鸡源鲍氏志贺菌;人痢疾志贺菌;鸡白痢沙门菌;鸡致病性大肠杆菌;进化地位;RAPD 分析

【中图分类号】 S858.312.61

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)10-0012-07

Study on chicken *Shigella Boydii* by random amplified polymorphic DNA

YANG Xia, CHEN Lu, LIU Hong-ying, CHANG Hong-tao, WANG Chuan-qing

(Engineering College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: 【Objective】 The evolutionary position of chicken *Shigella boydii* was determined. 【Method】 The genetic diversity among strains of chicken *Shigella boydii*, *S. Pullorum*, *Enteroinvasive E. coli* and *Shigella Dysenteriae* was studied by random amplified polymorphic DNA (RAPD) with 6 random primers, and some special PCR products were cloned and sequenced, Further evolutionary relationships among chicken *Shigella boydii* and other related strains were examined based on sequences. 【Result】 Four efficient primers were selected from six 10 bp random primers. 64 RAPD bands were identified and 3 of them were common in all three species tested and 61 of them were polymorphic between any two strains. The percentage of polymorphism was 95.3%. The primer P2 could be used to differentiate chicken *Shigella boydii* and *S. Pullorum* from four bacterial strains. The result showed that the common rate of the amplified bands between *Shigella boydii* and *Shigella dysenteriae* was 66.7%, *Shigella boydii* and *Enteroinvasive E. coli* was 44.4%, but the amplified bands produced by *Shigella* and *S. Pullorum* was much different from each other when primer P6 was used, so the primer p6 could be used to differentiate the three species. The results for sequenced PCR products and examined evolutionary relationships showed that the chicken *Shigella boydii* may be a new species or subspecies from human. 【Conclusion】 The chicken *Shigella boydii* may be a new species or subspecies from human.

* [收稿日期] 2009-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30671555)

[作者简介] 杨 霞(1973—),女,河南扶沟人,副教授,博士,主要从事微生物和免疫学研究。E-mail:liyihan2001@163.com

[通信作者] 王川庆(1953—),男,河南濮阳人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病发病机理及防治研究。E-mail:wchuanq@sohu.com

Key words: chicken *shigella boydii*; *Shigella dysenteriae*; *S. Pullorum*; *Enteroinvasive E. coli*; evolutionary position; RAPD analysis

志贺菌属细菌是人急性感染性腹泻的主要病原体之一,也可感染人以外的灵长类动物。以往认为其对畜禽不感染,但自国外出现志贺菌感染犊牛、仔猪、小鼠、豚鼠的报道以来,国内也有从进口冷冻家禽中检出志贺菌的报道^[1-2]。2004 年,许兰菊等^[3]首次从自然发病鸡体内分离出志贺菌,该菌在生物学及血清学特性等方面与人志贺菌完全相同。因此,从分子水平研究鸡源志贺菌的进化地位,揭示鸡志贺菌的来源及其在公共卫生方面的潜在意义,是亟待解决的问题。随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术是由 Williams 和 Welsh 于 1990 年在 PCR 基础上发展起来的分子标记技术,由于该方法具有灵敏度高、操作简便等优点,故在基因的染色体定位、微生物的分类鉴定及物种亲缘关系的确定等方面得到广泛应用。本研究旨在利用 RAPD 技术对鸡源鲍氏志贺菌及人源痢疾志贺菌、鸡大肠杆菌和鸡白痢沙门菌进行多态性分析和分类鉴定,并对特异扩增片段进行克隆测序,以期进一步比较鸡源鲍氏志贺菌与 GenBank 中其他相关菌的遗传进化关系,探讨确定鸡源鲍氏志贺菌的进化地位及公共卫生意义。

1 材料与方法

1.1 菌株

鸡鲍氏志贺菌 hn03 株,由河南农业大学家畜传染病室保存;2 株痢疾志贺菌标准菌株,分别购自中国药品生物制品检定所(菌株号 51570)和广东省微生物研究所菌种保藏中心(菌株号 51105);鸡白痢沙门氏菌 O12,由河南农业大学家畜传染病室分离、鉴定并保存;鸡白痢沙门氏菌标准株(C79),购自中国兽药监察所;2 株鸡的肠致病性大肠杆菌(O78 和 O35),由河南农业大学家畜传染病室分离鉴定。

1.2 试剂

Taq 酶、dNTPs、细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒、DL15000、DL2000 DNA ladder、PMD18-T 载体、JM109 感受态细胞、胶回收试剂盒,均为大连宝生物工程有限公司产品;琼脂糖为 Sigma 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 随机引物

根据文献^[4]设计 6 条随机引物,由大连宝生物工程有限公司合成。这 6 条随机引物及序列如下:

P1: GAGCCCTCCA; P2: GTGCCTAACC; P3: GAACCTGCGG; P4: TGCCCGTCGT; P5: CAGCT-CACGA; P6: AGCGTCCTCC。

1.4 细菌基因组的提取

按照试剂盒操作手册提取细菌基因组,并采用分光光度计和电泳法计算 DNA 的含量及纯度。检验合格的样品于-20℃保存备用。

1.5 RAPD 反应条件的优化

采用拉丁方阵设计,对反应条件和参数进行优化,确定最终的反应条件。反应体系 25 μL: PCR Buffer(10×)2.5 μL, MgCl₂(25 mmol/L)4 μL、dNTP(10 mmol/L)2 μL、模板 DNA(20 ng/μL)2.5 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL,随机引物(50 pmol/μL)2 μL,重蒸水 12.5 μL。反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,36℃复性 1 min,72℃延伸 2 min,30 个循环;最后 72℃延伸 7 min。反应结束后,取 5 μL 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,并用凝胶成像分析系统拍照。

1.6 RAPD 稳定性试验

采用同批次的试剂,用同样方法重复以上试验,以检测 RAPD 的可重复性。

1.7 多态性分析

对扩增图谱合理取舍条带。取舍的标准是:重复性好的弱带可记录,重复性不好(无规律性)的弱带不作记录。以所有分析菌株为变量,以不同的扩增产物为样本,用 Quantity one 软件计算各片段的分子质量大小,经统计比较,得出片段总数、公共带数和多态性带数,分析 RAPD 反应的多态性。

1.8 特有扩增片段的克隆测序、序列分析及系统发育进化树的建立

对引物 P2 扩增产物中鸡源鲍氏志贺菌特有的约 1 kb 的片段,以及引物 P6 扩增产物中鸡的肠致病性大肠杆菌与志贺菌共有的 1.1 kb 的片段进行回收纯化,与 PMD18-T 载体连接后转化 JM109 感受态细胞,酶切鉴定挑选阳性克隆后送大连宝生物工程有限公司测序。采用 DNASTar 分析软件中 MegAlign 及 phylic 的邻位相连法,对测定的鸡源鲍氏志贺菌的基因序列和 GenBank 中已发表的相似序列进行比较,并绘制系统发育进化树。本研究中用于进化分析的菌株如表 1 所示。

表 1 本研究进化分析中应用的菌株及其来源

Table 1 Strains and origins used in the evolutionary analysis

序号 No.	菌株 Strain	登录号 Accession	序号 No.	菌株 Strain	登录号 Accession
1	宋内志贺菌 <i>Shigella sonnei</i> Ss046	CP000038	9	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> CFT073	AE014075
2	鲍氏志贺菌 4 型 <i>Shigella boydii</i> Sb227	CP000036	10	大肠杆菌 O157 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	AE005174
3	痢疾志贺菌 1 型 <i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	CP000034	11	大肠杆菌 K12 <i>Escherichia coli</i> K12(MG1655)	U00096
4	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> 536	CP000247	12	大肠杆菌 K12 <i>Escherichia coli</i> K12(MG1655)	U36841
5	福氏志贺菌 5 型 <i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401	CP000266	13	大肠杆菌 O157 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	BA000007
6	大肠杆菌 K12 <i>Escherichia coli</i> W3110	AP009048	14	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> UTI89	CP000243
7	福氏志贺菌 2a <i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301	AE005674	15	沙门菌 <i>Salmonella</i> , <i>Sstr.</i> ATCC9150	NC006511
8	福氏志贺菌 2a <i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T	AE014073			

2 结果与分析

2.1 DNA 模板的提取

提取的模板 DNA 经紫外分光光度计测定,结果显示样品 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均为 1.8~2.0,

满足 RAPD 反应对模板纯度的要求,且每个样品 DNA 都有 1 条清晰的主带,没有断裂或降解,片段长度均大于 15 kb,说明抽提的总 DNA 样品完整,可用于 RAPD 分析。

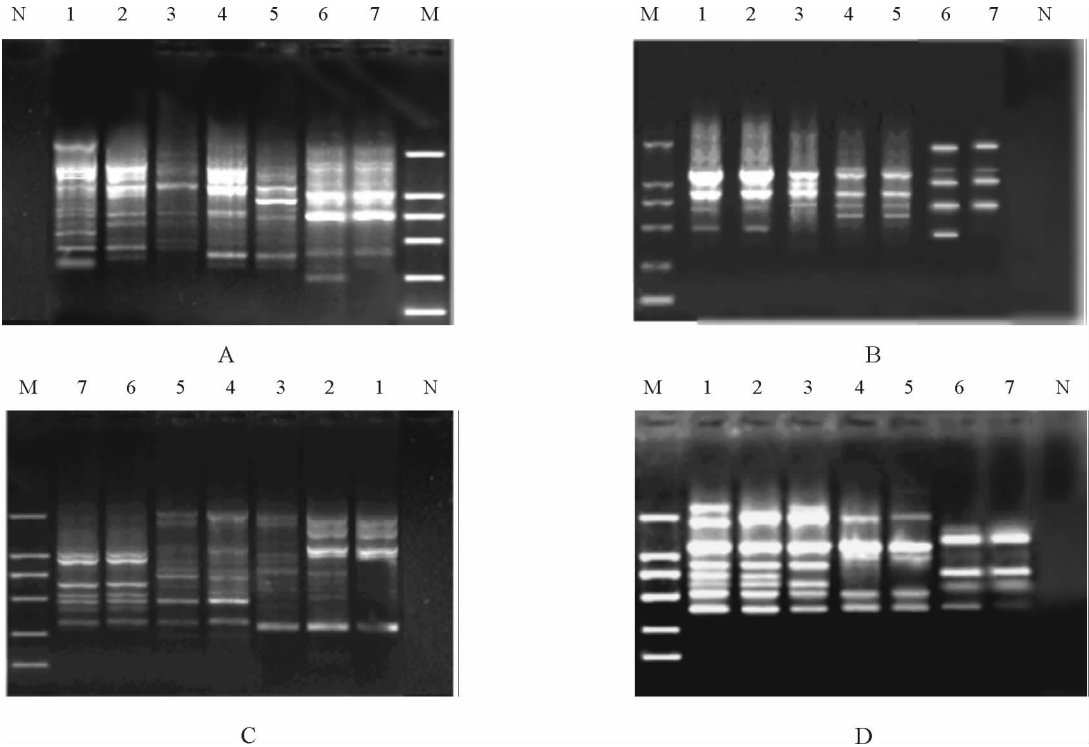


图 1 P1、P2、P4、P6 4 条随机引物对 7 株细菌的扩增图谱

A,B,C,D. 引物 P1、P2、P4、P6 对 7 株细菌的随机扩增图谱;M. 分子量标记(DL2000);1~7. 痢疾志贺菌 51570、痢疾志贺菌 51105、鸡鲍氏志贺菌、鸡肠致病性大肠杆菌 O78、鸡肠致病性大肠杆菌 O35、鸡白痢沙门氏菌 C79 和鸡白痢沙门氏菌 O12 的 RAPD 扩增图谱;N. RAPD 阴性对照

Fig 1. RAPD band patterns of PCR products of 7 bacterial strains by primer P1,P2,P4,P6

A,B,C,D. RAPD band patterns of 7 bacterial strains by primer P1,P2,P3 and P4;
M. DL2000 DNA Maker;1-7. PCR products respectively for *Shigella dysenteriae* 51570,*Shigella dysenteriae* 51105,*shigella* *Boydii*,
Chicken Enteropathogenic Ecoli O78, *Chicken Enteropathogenic Ecoli* O35,*S. Pullorum* C79 and *S. Pullorum* O12;N. Negative control

2.2 RAPD 反应的可重复性

利用本研究的反应条件,随机选取 6 条引物中的任意 1 条对 7 株试验菌株进行 RAPD 扩增,产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,结果表明不同批次 RAPD 产物的电泳图谱均表现出较好的重复性。

2.3 RAPD 反应的多态性

多态性分析结果表明,在所选用的 6 条引物中,引物 P3、P5 的多态性较差,仅能对 7 株细菌中的 1 株或 2 株扩出条带,且条带数较少;另外 4 条引物

P1、P2、P4、P6 均表现出较好的多态性(图 1、表 2),共扩增出 64 条 DNA 片段,其中 61 条为多态性片段,多态率为 95.3%。

志贺菌的 3 个菌株共扩增出 40 条片段,其中有多态性片段 22 条,多态率为 55.0%;鸡白痢沙门氏菌的 2 个菌株共扩增出 26 条片段,其中有 3 条多态性片段,多态率为 11.5%;鸡的肠致病性大肠杆菌的 2 个菌株共扩增出 30 条片段,多态性片段有 8 条,多态率为 26.7%。

表 2 4 条引物对 3 种细菌扩增出的 RAPD 总带数、公共条带数及其多态率

Table 2 Total RAPD bands, common bands and their polymorphous rate of different bacterial strains

引物 Primer	菌种 Bacterium	总条带数		公共带数		多态性带数		多态率/%	
		Totally RAPD band		Common band		Polymorphous band		Polymorphous rate	
		种内 Intra	种间 Inter	种内 Intra	种间 Inter	种内 Intra	种间 Inter	种内 Intra	种间 Inter
P1	志贺菌 <i>Shigella</i>	14		6		8		57.1	
	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella. pullorum</i>	7	21	6	1	1	20	14.3	95.2
	肠致病性大肠杆菌 <i>Enteropathogenic Ecoli</i>	8		4		4		50.0	
P2	志贺菌 <i>Shigella</i>	5		3		2		40.0	
	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella. pullorum</i>	5	11	5	1	0	10	0	91.0
	肠致病性大肠杆菌 <i>Enteropathogenic Ecol</i>	5		4		1		20.0	
P4	志贺菌 <i>Shigella</i>	12		3		9		75.0	
	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella. pullorum</i>	8	20	7	0	1	20	12.5	100.0
	肠致病性大肠杆菌 <i>Enteropathogenic Ecoli</i>	11		9		2		18.2	
P6	志贺菌 <i>Shigella</i>	9		6		3		33.3	
	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella. pullorum</i>	6	12	5	1	1	11	16.7	91.7
	肠致病性大肠杆菌 <i>Enteropathogenic Ecoli</i>	6		5		1		16.7	
合计 Total	志贺菌 <i>Shigella</i>	40		18		22		55.0	
	鸡白痢沙门氏菌 <i>Salmonella. pullorum</i>	26	64	23	3	3	61	11.5	95.3
	肠致病性大肠杆菌 <i>Enteropathogenic Ecoli</i>	30		22		8		26.7	

2.4 扩增图谱的分析

通过对多态性较好的 4 个有效引物的 RAPD 图谱进行分析,发现引物 P2 的扩增谱中,7 个菌株均有 1 条 700 bp 左右的共同谱带,志贺菌和鸡肠致病性大肠杆菌的谱带特别相似,而鸡白痢沙门菌与其差异很大,因此根据引物 P2 的扩增图谱,可将志贺菌、鸡肠致病性大肠杆菌与鸡白痢沙门氏菌鉴别出来;在引物 P6 的扩增谱中,7 个菌株均有 1 条约 350 bp 的共同谱带,同种菌株间谱带特别相似,鸡鲍氏志贺菌与人痢疾志贺菌有 66.7%的 DNA 条带相同,并且各有自己的特征性谱带。2 株鸡肠致病性大肠杆菌谱带间以及 2 株鸡白痢沙门氏菌株间有 83.3%的 DNA 条带相同,由此可以证明,引物 P6 的扩增图谱可用于细菌种的鉴别。

2.5 扩增片段的序列分析及系统发育进化树的构建

2.5.1 序列分析 由测序结果可知,引物 P2 扩增的鸡源鲍氏志贺菌图谱特有的约 1 kb 的片段中,包含有 *adiY* 基因及 *yjdE* 基因(其在 Genbank 的登录号分别为 DQ995262 和 DQ995266);引物 P6 扩增的鸡肠致病性大肠杆菌与志贺菌共有的 1 100 bp 左右的片段中,鸡源鲍氏志贺菌序列中包含 *acpS* 及 *pdxJ* 2 个基因(其在 Genbank 的登录号分别为 DQ995268 和 DQ995267);2 株痢疾志贺菌和 2 株鸡肠致病性大肠杆菌序列为保守蛋白基因 *ygdH* 的部分序列(痢疾志贺菌 51570、51105 和鸡肠致病性大肠杆菌 O78、O35 的 *ygdH* 在 Genbank 的登录号分别为 EF593031、EF593030、EF593029 和

EF593032)。

2.5.2 *adiY*、*yjdE*、*acpS*、*pdxJ* 4 个基因相应进化

树的构建 分别选择 GenBank 中已发表的相似序列,用邻位相连法构建遗传发育树(图 2)。

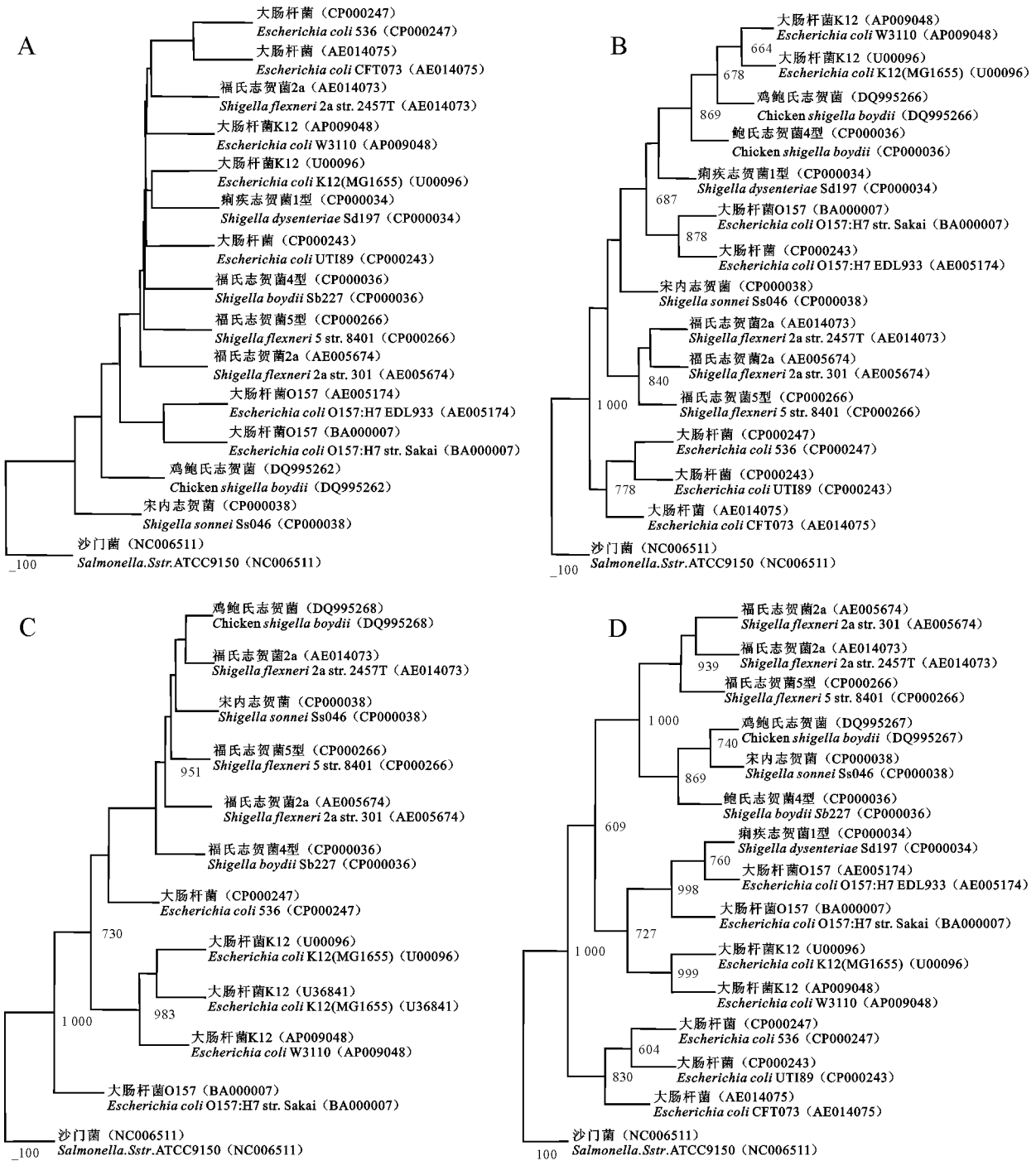


图 2 鸡源鲍氏志贺菌的进化树分析

(分支中的数据为分析 1 000 次的置信度;A,B,C,D 分别为 *adiY*、*yjdE*、*acpS*、*pdxJ* 构建的进化树)

Fig. 2 Phylogenetic tree of chicken *Shigella boydii*

(Bootstrap values are 1 000 replications; A,B,C,D repectly for *adiY*、*yjdE*、*acpS*、*pdxJ* gene phylogenetic tree)

由图 2 可知,4 个进化树均分为 2 个主干分支:一支为沙门菌分支,另一支为大肠杆菌和志贺菌分支。根据拓扑结构及进化距离可知,由 *adiY* 构建的进化树中,鸡源鲍氏志贺菌与福氏志贺菌和鲍氏

志贺菌 4 型等最近(图 2-A);在 *yjdE* 构建的进化树中,鸡源鲍氏志贺菌分布于大肠杆菌与志贺菌分支中的鲍氏志贺菌 4 型和大肠杆菌 K12 小分支中(图 2-B);由 *acpS* 基因构建的进化树中,鸡源鲍氏志贺

菌分布于志贺菌的独立分支中,且与福氏志贺菌 2a 同源关系较近,其次为宋内志贺菌(图 2-C);在 *pdxJ* 基因构建的进化树中,鸡源鲍氏志贺菌分布于志贺菌分支中的鲍氏志贺菌与宋内志贺菌的小分支中(图 2-D)。根据以上的进化关系可进一步确定,鸡源鲍氏志贺菌可能是人源志贺菌的一个变异株或新的亚种。

3 讨 论

鸡源鲍氏志贺菌是新近发现的可引起鸡发病的一种病原菌^[1],目前对其许多特性,尤其是分子生物学特性尚不清楚。同时,由于鸡源鲍氏志贺菌可能与志贺菌有密切关系,因此对其进行 RAPD 分子标记研究,不仅在临诊断和病原鉴定方面有一定的实用价值,而且在公共卫生学方面也有重要意义。

RAPD 方法是一项基于 PCR 技术的 DNA 多态性分子标记检测技术,该方法具有操作性强、快速、分辨率高而且对模板 DNA 要求较低等优点,且该技术的多态性产物遵循孟德尔遗传定律,同源片段越多表明亲缘关系越近^[5-6]。本研究的 RAPD 结果显示,鸡源鲍氏志贺菌与人源痢疾志贺菌的同源片段最多,与鸡肠致病性大肠杆菌的同源片段数次之,而与鸡白痢沙门氏菌仅有极少的同源片段,其结果严格遵循孟德尔遗传定律。同时,本研究利用 RAPD 技术筛选出了 1 条可用于细菌种鉴别的随机引物 P6,该引物可一次性将志贺菌、鸡肠致病性大肠杆菌和鸡白痢沙门氏菌显著区分开来,鉴别结果比较理想,稳定性好。

由于 RAPD 采用的是短随机引物,所以其反应条件十分重要。因此,在进行 RAPD 反应时,应对所用的试剂、最佳反应条件等进行优化,才能得到理想的扩增结果^[7-9]。作者根据本研究及以往的相关研究^[10]经验发现,RAPD 的扩增反应只要保持同一反应体系及同一扩增程序,不同次的 RAPD 产物都能表现出较好的重复性,是一种较为有效的鉴别方法。

本研究中,作者对引物 P2 扩增谱中以鸡源鲍氏志贺菌基因组 DNA 为模板的 1 kb 左右的特有扩增片段进行了测序,由测序结果可知,该扩增片段包含 *adiY*、*yjdE* 2 个基因的部分序列,从而可以用该测定结果为探针检测该菌,进而为相关疾病的诊断和防治提供科学依据;同时,分别对引物 P6 扩增谱中以鸡肠致病性大肠杆菌基因组 DNA 及志贺菌基因组 DNA 为模板的 1 100 bp 左右扩增片段的共有序

列进行测序,由测序结果可知,肠致病性大肠杆菌与痢疾志贺菌的扩增片段完全相同,而鸡源鲍氏志贺菌与二者完全不同,说明部分扩增产物经电泳分离后,虽有相同的迁移率,但实际上所包含的基因却还存在差异,这也在一定程度上说明 RAPD 方法存在一定的局限性^[6]。

本研究对扩增产物中的部分特殊片段进行了测序与进化分析,在此基础上进一步确定鸡源鲍氏志贺菌可能是人源志贺菌的一个变异株或新的亚种。

【参考文献】

- [1] 陆季严,林 禧,林汉城.从进口家禽冻品检出志贺氏菌[J].动植物检疫,1996,20(1):22-24.
Lu J Y,Lin X,Lin H C. *Shigella* found from imported frozen poultry products [J]. Animal and Plant Quarantine, 1996, 20 (1):22-24. (in Chinese)
- [2] 尹 旭,陈惠清.从阿根廷进口冻鸡爪检出福氏志贺氏菌[J].中国动物检疫,1998,15(1):19-20.
Yin X,Chen H Q. *Shigella flexneri* found in frozen chicken claw imported from Argentina [J]. China Journal of Animal Quarantine, 1998, 15(1):19-20. (in Chinese)
- [3] 许兰菊,王川庆,胡政政,等.鸡志贺氏菌在我国的发现及其病原特性研究[J].中国预防兽医学报,2004,26(4):281-286.
Xu L J,Wang C Q,Hu G Z, et al. Discover on *shigellosis* of flock in China and studies on the pamogeny speciality [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2004, 26(4): 281-286. (in Chinese)
- [4] 汪铭书,程安春,李淑梅,等.鸭疫里氏杆菌、鸭源致病性大肠埃希氏菌和鸭沙门菌的 RAPD 研究[J].中国兽医科技,2004,34(10):3-8.
Wang M S,Cheng A C,Li S M, et al. Study on *pasteurella anatipestifer*, pathogenic *E. coli* and *Salmonella* in ducks by Random Amplified Polymorphic DNA [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2004, 34(10):3-8. (in Chinese)
- [5] 黄爱华,李君文,王新为.军团菌 D-RAPD 基因分型研究[J].中国卫生检验杂志,2002,12(6):648-649.
Huang A H, Li J W,Wang X W. Genotyping of *Legionella* species by D-RAPD [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2002, 12(6):648-649. (in Chinese)
- [6] 姜自锋,林乃铨,徐 梅. RAPD 技术及其应用中的一些问题[J].福建农林大学学报:自然科学版,2002,31(3):356-360.
Jiang Z F,Lin N Q,Xu M. A review on some technical problems in RAPD application [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2002, 31(3): 356-360. (in Chinese)
- [7] 谢志勤,谢芝勋,邓显文,等.用 RAPD 技术分析鸡毒霉形体广西分离株的 DNA 多态性[J].中国兽医科技,2003,33(4):26-29.
Xie Z Q,Xie Z X,Deng X W, et al. Study on DNA polymor-

phism of M G isolates from Guangxi of China by random amplified polymorphic DNA [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(4): 26-29. (in Chinese)

[8] Xian Z H, Cong W M, Zhang S H. Genetic alterations of hepatocellular carcinoma by random amplified polymorphic DNA analysis and cloning sequencing of tumor differential DNA fragment [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(26): 4102-4107.

[9] Levy H, Fisher M, Ariel N. Identification of strain specific markers in Bacillus anthracis by random amplification of polymorphic DNA [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 244(1): 199-205.

[10] 杨霞, 陈陆, 许兰菊, 等. RAPD 技术在鉴别志贺菌与沙门菌中的应用研究 [J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(1): 72-76.

Yang X, Chen L, Xu L J, et al. Study on of *Shigella* e and *S. Pullorum* by Random Amplified Polymorphic DNA [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2007, 41(1): 72-76. (in Chinese)

《农业工程学报》2010 年征订启事

《农业工程学报》是由中国科学技术协会主管、中国农业工程学会主办的全国性学术期刊,创刊于 1985 年。本刊被列为中国科技期刊引证报告(CJCR)分析和中国科学引文数据库(CSCD)的源期刊;连续多年被选为全国中文核心期刊(农业工程类中位居榜首);被《农业科学——农业工程文摘》长期收录;被国际权威检索系统(Ei Compendex)核心收录;被俄罗斯《文摘杂志》、英联邦农业局国际生物中心(CAB International)、美国剑桥科技文摘(Cambridge Scientific Abstracts, CSA)等国内外多家权威或著名检索系统固定收录。被万方数据网中国数字化期刊群、中国科技期刊网 中国学术期刊(光盘版)全文上网收录。

《农业工程学报》2009 年被中国科技信息研究所文献分析中心遴选为“首批精品科技期刊”,同年被中国科协评为“精品期刊工程项目”期刊,并在武汉大学中国科学评价研究中心 2009 年发布的《中国学术期刊评价研究报告》中,被评为权威期刊之一(我国权威期刊 311 种占总学术期刊总数的 5%)。

本刊还与美国农业工程师学会、韩国农业工程学会、日本土木工程学会、美国国家农业图书馆等建立交换关系。

《农业工程学报》主要栏目有农业水土工程、农业装备工程与机械化、农业信息与电气技术、农业生物环境与能源工程、土地整理工程、农产品加工工程。

《农业工程学报》为月刊,大 16 开本,每期正文 300 页左右;中国标准连续出版物号:ISSN 1002-6819, CN 11-2047/S;邮发代号:18-57,每期定价 50 元,全年 12 期,共 600 元。若直接向编辑部订阅,均可享受八折优惠。

编辑部地址:北京市朝阳区麦子店街 41 号

《农业工程学报》编辑部

邮 编:100125

电 话:010-65910066-2503/3503

电话兼传真:010-65929451

电子信箱: tcsae@tcsae. org tcsae@sohu. com

学报网址: www. tcsae. org