

实时荧光定量 PCR 法快速检测赤潮环状异帽藻

石彦红^{1,2}, 张凤英², 马凌波^{1,2}

(1. 上海海洋大学 生命科学与技术学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 以环状异帽藻(*Heterocapsa circularisquama*) ITS1 区为靶序列设计了一对特异性引物, 运用 Real-time PCR 方法, 对环状异帽藻进行了定性定量检测。以其他 9 种赤潮微藻为对照验证其特异性。结果表明, 仅含环状异帽藻 DNA 模板的样品有扩增, 其他藻没有检测到扩增信号。以超声波破碎得到的藻液为标准品, 所得标准曲线具有高度线性相关, 相关系数 R^2 为 0.989, 并且可以在 30 个循环内检测到 0.5 个细胞。对在不同培养条件下获得的环状异帽藻 DNA 样品进行检测, 都能获得扩增信号。利用该方法建立的标准曲线对初步模拟现场样品进行定量检测, 与显微镜计数结果基本一致。[中国水产科学, 2010, 17(2): 267-273]

关键词: 环状异帽藻; Real-time PCR; ITS1; 鉴定; 定量检测

中图分类号: S835

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0267-07

环状异帽藻(*Heterocapsa circularisquama*) 属有毒赤潮藻类, 于 1988 年在日本西海岸首次引发赤潮, 造成大量贝类死亡^[1-2]。近年来在中国的大连海岸也有类似赤潮发生^[3]。2005 年王金辉等^[4]对长江口及邻近海域有毒藻进行了调查, 发现在该海域引发赤潮的微藻是环状异帽藻。据报道, 环状异帽藻可产生一种光敏感性溶血毒素(photosensitizing hemolytic toxin), 低浓度情况下就可以使贝类致死, 而对鱼类无害^[5-7]。为更深入了解环状异帽藻的种群动力学和产毒情况, 有必要对该藻的定性和定量检测方法开展研究。

传统的鉴定方法主要以形态学特征为基础, 即海水样品采集后利用光学或电子显微镜直接观察等。这些方法操作费时费力, 无法进行长期的跟踪监测, 且对于某些浮游植物难以作出准确的鉴定^[8]。由于不同种属间基因的多样性, 常采用分子生物学

技术鉴定和定量赤潮微藻^[9-12]。因此, 如何利用分子生物学技术找到种间界定的稳定指标, 进而建立快速、准确的鉴定和定量检测方法, 已成为浮游植物生态研究的热点之一, 也是在实现赤潮监测和预警过程中亟待解决的问题。

近年来, PCR (Polymerase chain reaction) 方法已成为微生物领域重要的检测手段^[13-15]。此基础上发展起来的实时荧光定量 PCR (Real-time RCR) 技术, 以 Power SYBR Green 和溶解曲线为基础, 可以用于检测不同的核苷酸序列。因为不同的 PCR 产物, GC 含量、片段长度、核苷酸组成不同, 因此 T_m (melting temperature) 值也不同, 所以其溶解曲线也不同^[16]。该技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、检测速度快等优点, 得到了广泛的应用^[17]。Real-time PCR 方法也被用于多种赤潮藻类的鉴定和定量检测^[17-20]。利用 Real-time PCR 方法

收稿日期: 2009-08-04; 修订日期: 2009-11-03.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院东海水产研究所)资助项目(2007M22); 上海市科学技术委员会科研计划项目(062358101).

作者简介: 石彦红(1985-), 女, 硕士研究生. 专业方向为水生生物学. E-mail: shihong0123456@163.com

通讯作者: 马凌波, 研究员, 研究方向: 生物技术和遗传育种. E-mail: malingbo@sina.com

定量检测环状异帽藻的应用研究国内外均未见报道。本研究以环状异帽藻为研究对象,以 ITS1 区为目标片段设计了 1 对特异性引物,并结合 Power SYBR Green Mater Mix,建立了定量检测赤潮环状异帽藻 Real-time PCR 的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

环状异帽藻系本研究的目标藻,其他藻用于检验此方法的特异性。微藻在实验室中用常规的 *f/2* 培养基培养至对数期,培养条件为光照/黑暗周期 12 h/12 h,光照强度 4 000 lx,培养温度:光照 22 °C,黑暗 20 °C^[6,21]。环状异帽藻(*H. circularisquama*)、短凯伦藻(*Karenia brevis*)、微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)由国家海洋局东海分局王金辉馈赠;角毛藻(*Chaetoceros* sp.)、赤潮异弯藻(*Heterosigma akashiwo*)本实验室保存藻种;原甲藻(*Prorocentrum* sp.)、前沟藻(*Amphidinium* sp.)、利玛原甲藻(*P. lima*)、微小亚历山大藻(*Alexandrium minutum*)由台湾大学周宏农教授提供;塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*)、链状亚历山大藻(*A. catenella*)、米氏凯伦藻由暨南大学吕颂辉教授馈赠。

1.2 基因组 DNA 的制备

离心收集细胞,使用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)提取微藻 DNA。

破碎藻液制备,离心收集细胞,然后用 10 mL 灭过菌的去离子水洗涤 2 次并重悬,置于 50 mL 离心管中,在冰浴,超声波功率 200 W、超声时间 3 s、间隔时间 3 s 的条件下超声波处理^[22], -20 °C 保存。

1.3 测序

从环状异帽藻总 DNA 中取 1 μL 加入 24 μL 的 PCR 反应液中(在 25 μL 的反应体系中包括 10 × PCR buffer, 2.5 mmol/L 的 dNTP, 1 U 的 *Taq* 酶, 灭菌 ddH₂O, 正反向引物的浓度 10 μmol/L) 进行 PCR 反应,扩增环状异帽藻的 ITS (internal transcribed space) 序列。PCR 引物参考庄丽等^[23] 序列,扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 于 Eppendorf Thermal Cycler 进行 PCR 扩增。PCR 产物由桑尼基因公司测序。

1.4 Real-time RCR 扩增

用 MEGA 4 软件对测得的序列与从 GenBank 获得的同源序列进行比对分析,选择 ITS 区域中与其他微藻有显著差异的 ITS1 区,用 Primer Express 3.0 设计出适合于 SYBR Green 法的荧光定量引物,并将设计引物与 GenBank 中序列进行 blast 比对。环状异帽藻的 SYBR 法荧光定量引物(图 1),正向引物 Ymits1F: 5' -GGGCGGAGATCGTATCAAAA-3', 反向引物 Ymits1R: 5' -TGAGAACAGGGAGCCGAG A-3', 引物由北京赛百盛基因有限公司合成。环状异帽藻目标片段 ITS1 区荧光定量产物长度为 107 bp。Real-time PCR 扩增于 Applied Biosystem StepOne Plus 上进行,扩增体系为 20 μL 体系,2 μL 基因组 DNA, 1 × Power SYBR Green Mater mix, 终浓度为 200 nmol/L 的 Ymits1F 和 Ymits1R, 7.2 μL ddH₂O。反应条件: 94 °C 10 min, 94 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环; 溶解曲线: 94 °C 15 s, 60 °C 1 min, 然后以 0.3 °C/s 缓慢升高至 94 °C, 94 °C 15 s。

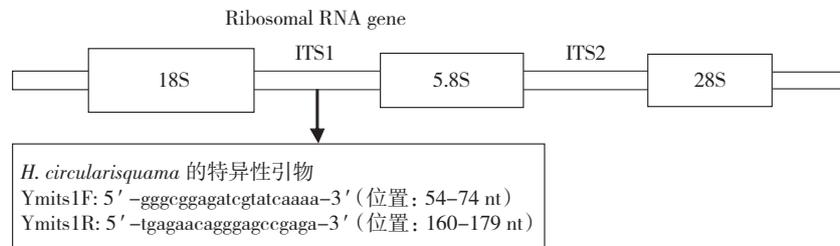


图 1 环状异帽藻引物的位置和序列

Fig. 1 Position and sequence of *H. circularisquama* primers

2 结果与分析

2.1 测序结果

测得长度为 595 bp 的 ITS 序列。所得序列与 Yoshida 等^[24]所测的环状异帽藻序列(GenBank 序列号 AB084091)相似度为 100%。

2.2 引物设计与特异性验证

环状异帽藻的引物以其 ITS1 序列为目标片段设计,分别对不同种藻的 DNA、破碎藻液及其混合

物进行 Real-time PCR 扩增(图 2)。Real-time PCR 扩增结果,从图 2 扩增曲线图上可以看出,含有阳性环状异帽藻的 DNA 基本上从相同的循环开始扩增,扩增结果没有差别,说明本研究用于鉴定环状异帽藻的引物很稳定,其他藻的 DNA 对环状异帽藻 Real-time PCR 扩增没有影响。其他藻或几种藻的混合物或者空白对照中都没有检测到信号,说明该引物具有很强的特异性。从图 2 溶解曲线图上可以看出,产物的 T_m 值相同,均为 83.5 °C。

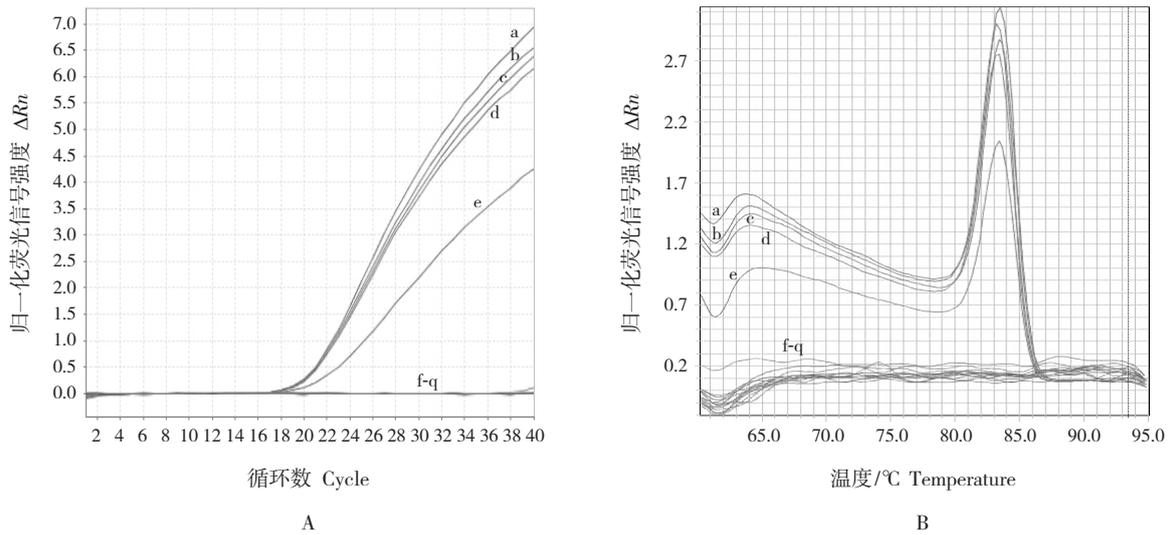


图 2 环状异帽藻引物的特异性实验

A: 环状异帽藻 Real-time PCR 扩增曲线; B: 环状异帽藻 Real-time PCR 的溶解曲线

a: 环状异帽藻 DNA; b: 环状异帽藻和利玛原甲藻、米氏凯伦藻、塔玛亚历山大藻的 DNA 的混合物; c: 环状异帽藻和微小原甲藻、短凯伦藻、前沟藻的 DNA 混合物; d: 环状异帽藻和角毛藻、赤潮异弯藻、微小亚历山大藻的 DNA 混合物; e: 环状异帽藻 DNA 和塔玛亚历山大藻、微小原甲藻、短凯伦藻、利玛原甲藻的超声波破碎藻液的混合物; f: 塔玛亚历山大藻、米氏凯伦藻、利玛原甲藻、微小原甲藻、前沟藻的 DNA 混合物; g: 角毛藻、赤潮异弯藻、短凯伦藻、原甲藻的超声波破碎藻液混合物; h: 塔玛亚历山大藻 DNA; i: 微小原甲藻 DNA; j: 米氏凯伦藻 DNA; k: 短凯伦藻 DNA; l: 微小亚历山大藻 DNA; m: 利玛原甲藻 DNA; n: 前沟藻 DNA; o: 赤潮异弯藻 DNA; p: 角毛藻 DNA; q: 空白对照。

Fig. 2 Specificity test of *H. circularisquama* primers

A: Real-time PCR amplification plot of *H. circularisquama*; B: Real-time PCR melt curve of *H. circularisquama*.

a: *H. circularisquama* DNA; b: the mixture DNA of *H. circularisquama*, *P. lima*, *K. mikimotoi* and *A. tamarensis*; c: the mixture DNA of *H. circularisquama*, *P. minimum*, *K. brevis* and *Amphidinium* sp.; d: the mixture DNA of *H. circularisquama*, *Chaetoceros* sp., *H. akashiwo* and *A. minutum*; e: *H. circularisquama* DNA and the mixture of ultrasounds from *A. tamarensis*, *P. minimum*, *K. brevis* and *P. lima*; f: the mixture DNA of *A. tamarensis*, *K. mikimotoi*, *P. lima*, *P. minimum* and *Amphidinium* sp.; g: the mixture of ultrasounds from *Chaetoceros* sp., *H. akashiwo*, *K. brevis*, *Prorocentrum* sp.; h: *A. tamarensis* DNA; i: *P. minimum* DNA; j: *K. mikimotoi* DNA; k: *K. brevis* DNA; l: *A. minutum* DNA; m: *P. lima* DNA; n: *Amphidinium* sp. DNA; o: *H. akashiwo* DNA; p: *Chaetoceros* sp. DNA; q: negative control.

2.3 Real-time PCR 标准曲线的建立和灵敏度检测

离心收集一定体积的环状异帽藻细胞,灭菌去离子水重悬,然后超声波破碎,将破碎后得到的藻液按 1:10 倍稀释(从 5 000 个细胞到 0.5 个细胞),

5 个稀释度,每个稀释度 3 个重复。各取 2 μL 破碎藻液,采用本研究设计的 Ymits 引物进行 Real-time PCR 检测。然后以显微镜下获得的细胞数为横坐标,以 Real-time PCR 扩增得到的 C_T 值为纵坐标绘制标

准曲线。Real-time PCR 结果如图 3 所示。回归方程为： $y=-3.277x+43.708$ ，其中 x 为细胞数， y 为 C_T 值，其回归系数为 0.989。用该方法建立的标准曲线

灵敏度重复性好，标准曲线各点之间成高度线性，在 30 个循环内就可以检测到 0.5 个细胞。

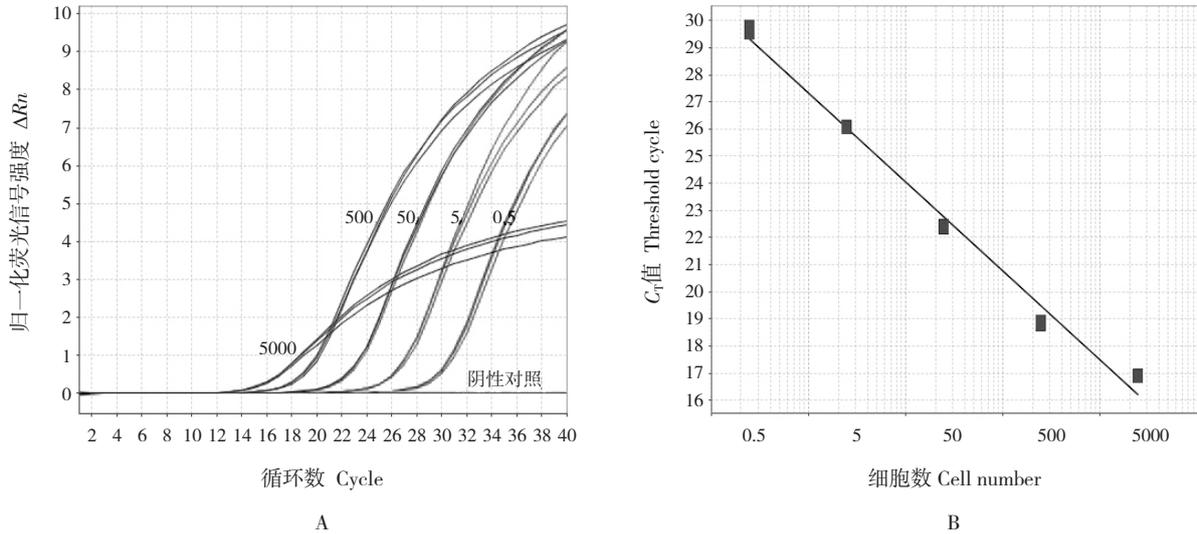


图 3 各稀释度环状异帽藻藻液 Real-time PCR 扩增结果

A: 各稀释度环状异帽藻藻液 Real-time PCR 扩增曲线; B: 各稀释度环状异帽藻藻液 Real-time PCR 的标准曲线.

Fig. 3 Real-time PCR results of diluted extract of *H. circularisquama*

A: Real-time PCR amplification plot of diluted extract of *H. circularisquama*; B: Standard curve developed for *H. circularisquama* with real-time PCR.

2.4 Real-time PCR 稳定性检测

不同培养条件下获得的细胞用于 Real-time PCR 稳定性检测。首先，培养温度不同，分别培养在 20℃、30℃，培养 10 d。同时，N/P 比值不同的培养基，分别在 3 种不同的培养基中（缺氮、缺磷和正常的 *f/2* 培养基，培养温度均为 20℃）培养 10 d。提取各培养物的 DNA，进行 Real-time PCR 扩增，结果见图 4。4 种不同条件下获得的 DNA Real-time PCR 都有扩增。说明不同的培养条件对 Real-time PCR 反应没有影响，该方法适合于现场样品的检测。

2.5 初步模拟现场样品检测

取 3 mL 包含环状异帽藻藻液，用于显微镜进行计数；再从同一瓶中取 10 mL 藻液离心收集细胞，并用 10 mL 无菌去离子水重悬，超声波对样品进行破碎，并对得到的细胞液进行适当的稀释，然后作为 Real-time PCR 模板进行扩增，根据各样品所得的 C_T

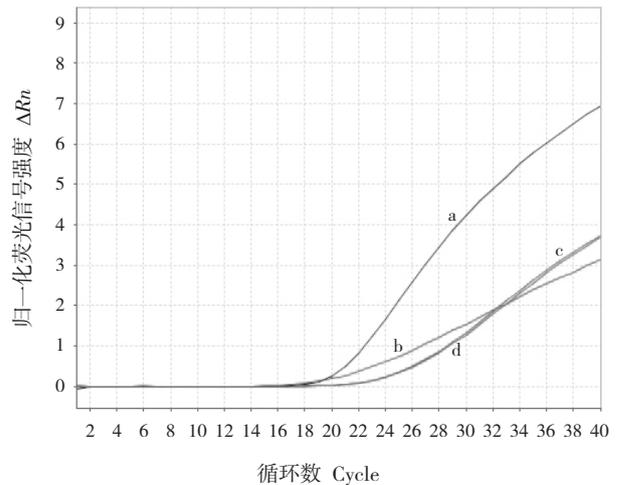


图 4 环状异帽藻引物的稳定性实验

a: 20℃培养; b: 30℃培养; c: 缺氮培养; d: 缺磷培养

Fig. 4 Stability test of the real-time PCR method for detection of *H. circularisquama*

a: 20℃ cultivation; b: 30℃ cultivation; c: lack of N cultivation; d: lack of P cultivation

值,按照 2.3 所得到标准方程计算出细胞数量。每个样品检测设定 3 个平行,结果如表 1 所示。从表

1 可以看出, Real-time PCR 定量结果与显微镜计数结果基本一致。

表 1 显微镜计数与 Real-time PCR 技术计数结果比较
Tab. 1 Comparison between results obtained by microscope and real-time PCR assay

样品编号 Sample	显微镜计数结果 Cell number by microscope	Real-time PCR 检测结果 Cell number by Real-time PCR method
1	$(1.20 \pm 0.29) \times 10^8$	$(1.07 \pm 0.058) \times 10^8$
2	$(1.39 \pm 0.31) \times 10^8$	$(1.42 \pm 0.050) \times 10^8$
3	$(7.70 \pm 0.20) \times 10^7$	$(8.06 \pm 0.045) \times 10^7$
4	$(7.00 \pm 0.25) \times 10^7$	$(6.69 \pm 0.034) \times 10^7$
5	$(6.20 \pm 0.36) \times 10^7$	$(5.26 \pm 0.058) \times 10^7$
6	$(8.60 \pm 0.56) \times 10^7$	$(7.15 \pm 0.036) \times 10^7$

3 讨论

自 1988 年以来环状异帽藻在日本西部海湾多次引发赤潮,对当地的贝类养殖造成严重的影响^[6]。近年来在中国大连和长江口附近海域,也曾多次发现由环状异帽藻引发的赤潮^[2-3]。环状异帽藻作为一种外来入侵的赤潮藻类,已经危害到了中国沿海的水产养殖业和生态环境,因此需要在海洋赤潮藻类预防预报以及对外来轮船压舱水检测等工作中重视对环状异帽藻的检测。

在赤潮藻类的分子鉴定中,通常采用 rDNA 家族基因作为鉴定的目标基因^[25]。由于 rDNA 的高度保守性^[26],其大小亚基、5.8S rDNA、ITS1 和 ITS2 区经常被选作 PCR 扩增区域。其中,ITS 区由于不加入成熟的核糖体,所以受到的选择压力较小,进化速度大于大亚基和小亚基^[27],较适合属间、种间水平的系统分类^[28]。本研究选择 ITS1 区作为 Real-time PCR 扩增区域,检测环状异帽藻取得了较好的效果。

近年来,以 Real-time PCR 方法检测赤潮微藻在国内外均有报道。Casper 等^[18]建立了以核酸序列为基础的 PCR 扩增 (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA) 检测短凯伦藻的方法,该方法以 rbcL mRNA 为靶序列,灵敏、高效、快速,能对环境中的短凯伦藻进行定量检测。Hosoi-Tanabe 等^[20]建立了以 28S rDNA 为基础的 Real-time PCR 方法,该方法不但适用于实验室样品、由固定剂保存

的水环境样品和现场样品,而且还能精确检测定量到 1 个细胞。何闪英等^[17]建立了以 18S rDNA 为基础的 Real-time PCR 方法,鉴定并定量检测了赤潮圆海链藻 (*Thalassiosira rotula*)。然而,以上 Real-time PCR 检测方法一般都采用试剂盒或酚氯仿抽提法制备模板,这些方法抽提取 DNA 或 RNA 的过程繁琐、耗时,不利于大量样本的处理。此外,由于过程的繁琐,每个抽提的步骤都容易损失不等量的 DNA,致使结果不能真实,不能准确地反应样本的模板量和细胞数。因此,赤潮藻类模板 DNA 的制备一直是 Real-time PCR 准确定量的瓶颈^[19]。Foulds 等^[29]研究表明,用不同提取方法得到的 DNA 提取物分别做 Real-time PCR,结果有很大差异。曾使用了改良的 CTAB 法^[30]、植物基因组 DNA 提取试剂盒制备的模板 DNA,纯度较高,可以作为 Real-time PCR 定性实验的模板,但是得到的定量结果与镜检有较大差别,定量结果与镜检分别相差在 1.2% ~ 53.8% 和 16.5% ~ 201.2% 之间(数据未列出)。而超声波方法破碎藻细胞,在超声波功率 200 W、超声时间 3 s、间隔时间 3 s 的条件下超声波处理 4 min,镜检环状异帽藻的破碎率可达 100%。用该方法得到的藻细胞液作为模板,由于破碎后释放的内容物对扩增有抑制作用,须根据细胞浓度对藻液进行适当的稀释。用该方法得到的藻细胞液作为模板,从结果可以看出与镜检结果吻合度很高。该方法得到的标准曲线线性好 ($R^2=0.989$),灵敏度高,最低检测限度 ≤ 0.5

个细胞。因此,在本研究建立的 Real-time PCR 方法中,敏感度检测和初步模拟现场样品检测均采用超声波破碎得到的藻液,从而省去了 DNA 抽提和纯化的过程,使得操作简单、省时。

合适的特异性引物是 Real-time PCR 方法能够鉴定检测到种的关键。本研究选择环状异帽藻的 ITS1 区设计引物,该引物与 GenBank 中的序列 blast 比对结果显示与环状异帽藻有最大相似度;同时做了初步现场模拟实验,将其他多种微藻的 DNA 与环状异帽藻 DNA 混合,研究发现其他藻 DNA 对环状异帽藻的扩增基本没有影响,不含环状异帽藻靶序列的样品无扩增,但是 DNA 浓度过大会对扩增产生抑制作用(数据未列出);与在不同培养条件下获得的环状异帽藻的 DNA 实验结果相同都有扩增,说明该引物特异、稳定,适合于 Real-time PCR 方法定量检测环状异帽藻。但是由于藻种的限制,本研究没有与环状异帽藻同属的其他藻种的特异性对照,该问题有待于进一步的研究。

本研究建立的 Real-time PCR 定量检测的环状异帽藻的方法,特异性好,灵敏度高,稳定性好,重复性好,检测速度快,整个过程在 2 h 内完成,有利于处理大量的样本;不仅可以对高浓度时的环状异帽藻进行准确的定量,同时最低检测限度 ≤ 0.5 个细胞。因此,该方法不仅可以用于赤潮发生时对环状异帽藻定量检测,而且可以用于低密度时对该藻进行实时监控,这对环状异帽藻赤潮的准确预报预测具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Lesser M P, Shumway S E. Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve molluscs [J]. Shellfish Res, 1993, 12: 377-381.
- [2] Horiguchi T. *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae): a new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan [J]. Phycolog Res, 1995, 43: 129-136.
- [3] 杜佳垠. 异囊藻赤潮生物及其对渔业的影响 [J]. 河北渔业, 2005, 2: 15-16.
- [4] 王金辉, 秦玉涛, 刘材材, 等. 长江口及邻近海域有毒藻类和赤潮毒素的本底调查 [J]. 海洋湖沼通报, 2007, 1: 52-61.
- [5] Sato Y, Oda T, Muramatsu T, et al. Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate [J]. Aqu Toxicol, 2002, 56: 191-196.
- [6] Miyazaki Y, Nakashima T, Iwashita T, et al. Purification and characterization of photosensitizing hemolytic toxin from harmful red tide phytoplankton, *Heterocapsa circularisquama* [J]. Aqu Toxicol, 2005, 73: 382-393.
- [7] Nagai K, Honjo T, Go J, et al. Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor [J]. Aquaculture, 2006, 255: 395-401.
- [8] Rehnstam-Holm A S, Godhe A, Anderson A M. Molecular studies of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Sweden and North America [J]. Phycologia, 2002, 41 (4): 348-357.
- [9] Lenaers G, Scholin C A, Bhaud Y, et al. A molecular phylogeny of dinoflagellate protists (Pyrrophyta) inferred from the sequence of 24S ribosomal DNA divergent domains D1 and D8 [J]. J Molecul Evolut, 1991, 32: 53-63.
- [10] Scholin C A, Herzog M, Sogin M. Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae), II: sequences analysis of a fragment of the LSU rRNA gene [J]. J Phycol, 1994, 30: 999-1011.
- [11] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* (Dinophyceae) using DNA probes and whole-cell hybridization [J]. J Phycol, 1996, 32: 1049-1052.
- [12] Sako Y, Kim C H, Ninomiya H, et al. Isozyme and cross analysis of mating population in the *Alexandrium catenella/tamarense* species complex [J]. Toxic Mar Phytoplankt, 1990, 24: 320-323.
- [13] Guillou L, Nezan E, Cueff V, et al. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French coasts [J]. Protist, 2002, 153: 223-238.
- [14] Saito K, Drgon T, Robledo J A, et al. Characterization of the rRNA locus of *Pfiesteria piscicida* and development of standard and quantitative PCR-based detection assays targeted to the nontranscribed spacer [J]. Appl Environment Microbiol, 2002, 68: 5394-5407.
- [15] Scholin C A, Hallegraeff G M, Anderson D M. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions [J]. Phycologia, 1995, 34: 472-485.
- [16] Maurelli M P, Rinaldi L, Capuano F, et al. Development of a real-time PCR for the differentiation of the G1 and G2/G3 genotypes of *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol Res, 2009, 105: 255-259.
- [17] 何闪英, 吴小刚. 赤潮研究中圆海链藻实时荧光定量 PCR 检测

- 方法的建立 [J]. 水产学报, 2007, 31 (2): 193-198.
- [18] Casper E T, Paul J H, Smith M C. Detection and quantification of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* by real-time nucleic acid sequence-based amplification [J]. App Environm Microbiol, 2004, 70 (8): 4727-4732.
- [19] Galluzzi L, Penna A, Bertozzini E, et al. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate)[J]. Appl Environm Microbiol, 2004, 70 (2): 1199-1206.
- [20] Shoko H T, Sako Y. Species-Specific detection and quantification of toxic marine dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* by Real-Time PCR Assay [J]. Mar Biol, 2005, 7: 506-514.
- [21] Uchida T, Toda S, Matsuyama Y, et al. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture [J]. J Experim Mar Biol Ecol, 1999, 241: 285-299.
- [22] 王雪青, 苗惠, 翟燕. 微藻细胞破碎方法的研究 [J]. 天津科技大学学报, 2003, 22 (1): 21-25.
- [23] 庄丽, 陈月琴, 李钦亮, 等. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析 [J]. 海洋与湖沼, 2001, 32 (2): 149-154.
- [24] Yoshida T, Nakai R, Seto H, et al. Sequence analysis of 5.8S rDNA and the Internal Transcribed Spacer region in dinoflagellate *Heterocapsa* species (Dinophyceae) and development of selective PCR primers for the bivalve killer *Heterocapsa circularisquama* [J]. Microbes Environ, 2003, 18: 216-222.
- [25] Sogin M L, Elwood H J, Gunderson J H. Evolutionary diversity of eukaryotic small subunit rRNA genes [J]. Proc Nation Acad Sci Unit Stat Am, 1986, 83: 1383-1387.
- [26] Media M, Collins A G, Silberman J D, et al. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA [J]. Proc Nation Acad Sci Unit Stat Am, 2001, 98: 9707-9712.
- [27] Mandal R K. The organization and transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes [J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1984, 31: 115-158.
- [28] Steane D A, McClure B A, Clarke A E, et al. Amplification of the polymorphic 5.8S rRNA gene from selected *Australian gigartinean* species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction [J]. Phycology, 1991, 27: 758-762.
- [29] Foulds I V, Granacki A, Xiao C, et al. Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and E.coli in water by 5' -nuclease PCR [J]. J Appl Microbiol, 2002, 93: 825-834
- [30] 张桂和, 徐碧玉, 王珺. 几种海洋微藻基因组 DNA 的分离提取及 PCR 检测 [J]. 热带海洋学报, 2007, 26 (1): 68-72.

Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Heterocapsa circularisquama*

SHI Yanhong^{1,2}, ZHANG Fengying², MA Lingbo^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China)

Abstract: A real-time polymerase chain reaction (PCR) assay was designed and evaluated for rapid detection and quantification of the toxic algae *Heterocapsa circularisquama*. A pair of specific primers was designed from the sequence of ITS1 region, of which the PCR specificity was examined compared with the other nine dinoflagellates. PCR amplifications were detected only from samples which contained *H. circularisquama* cells, and specific signals were not detected from any other microalgae. Based on crushed algae by ultrasound for the standard, the standard curve we got has high linearity, and correlation coefficient R^2 was 0.989. Moreover, this assay can detect 0.5 cell within 30 cycles, showing its high sensitivity. DNAs from *H. circularisquama* that had been cultured in different conditions, were assayed in the run. Using the developed standard curves, *H. circularisquama* could be quantified in agreement with the quantification by optical microscopy. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2): 267-273]

Key words: *Heterocapsa circularisquama*; real-time PCR; ITS1; quantitative identification

Corresponding author: MA Lingbo. E-mail: malingbo@sina.com