

应用双特异分子探针技术定性定量检测 圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)^{*}

李秀芹¹ 于志刚^{2①} 甄 毓² 蔡青松³ 米铁柱⁴ 李荣秀⁵

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部 青岛 266003; 2. 中国海洋大学化学化工学院 青岛 266003;
3. 中国科学院上海生命科学研究院 上海 200031; 4. 中国海洋大学环境科学与工程学院 青岛 266003;
5. 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200030)

提要 设计了一套圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)特异性探针,运用双特异分子探针技术,对圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)进行了定性定量检测。结果表明,本实验中设计的一套探针与其它十几种藻无交叉反应,具有种特异性;细胞裂解液直接杂交检测优于提纯 RNA 样品检测;对自然样品做了初步检测,发现天然海水中的其它浮游生物对该检测方法影响很小。

关键词 圆海链藻, 双特异分子探针技术, 赤潮藻检测

中图分类号 X172

圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)隶属硅藻门、圆心硅藻目、海链藻科、海链藻属,是一种世界范围内广泛存在的广温广盐性浮游植物,也是我国近海常见的硅藻优势种之一,被列为中国沿岸赤潮生物种类名录(齐雨藻, 2003)。圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)增殖速度极快,并且能够产生一些短链的醛类物质(SCA, short-chain aldehydes),这些醛类物质能抑制桡足类卵的发育(Giulianad *et al.*, 2002; Miralto *et al.*, 1999; Adrianna *et al.*, 2004),当赤潮发生时能够影响桡足类的种群结构,硅藻对桡足类生殖的抑制作用为目前海洋生态学的研究热点之一。因此,准确、快速地检测圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)及其数量,了解其在海区的种群动态,对海洋生态环境特别是赤潮监测研究具有重要意义。

对于浮游植物的检测,传统的研究方法为形态学观察,随着现代科技的发展,一些先进的技术已经应用到浮游植物的鉴定与检测中,比如核酸探针技术(Simon *et al.*, 1997; Scholin *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000; Tyrrell *et al.*, 2001; 米铁柱等, 2003)、分子免疫

技术(Vrieling *et al.*, 1996; Scholin *et al.*, 1998; Xin *et al.*, 2005; 向军俭等, 2003)、实时荧光定量 PCR(Bowers *et al.*, 2000; Tengs *et al.*, 2001)及流式细胞术(Eschbach *et al.*, 2001)。另外 HPLC 技术(Kwan *et al.*, 2003; 姚鹏等, 2003)也应用到浮游植物检测中来。其中核酸探针技术因其迅速、方便、特异性强、易于实现自动化等优点,备受研究者青睐。核酸探针技术的前提是获得浮游植物的遗传信息,即浮游植物的分子鉴定,陈月琴等对一些赤潮藻的核糖体基因进行了序列测定及系统分析,获得了许多有意义的信息(陈月琴等, 1999、2002; 庄丽等, 2001); 张宝玉等(2004)和王波等(2006)对东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)等赤潮藻种的核糖体基因进行了克隆测序与系统分析,为进一步设计探针进行检测提供了必要的信息。黄邦钦等(2003)针对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的核糖体基因设计了特异性探针,应用荧光原位杂交技术(FISH, fluorescence in situ hybridization)对塔玛亚历山大藻进行了鉴定和检测。

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目, 2001AA635090 号; 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目, 2003AA635010 号; 自然科学基金资助项目, 40406028 号。李秀芹, E-mail: xiuqinli@ouc.edu.cn

通讯作者: E-mail: zhigangyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2007-06-04, 收修改稿日期: 2008-05-08

双特异分子探针技术是本实验室在夹心杂交和核酸酶保护分析技术的基础之上发明的一项全新的技术。核酸酶保护分析为一种常见的核酸分析方法,其主要原理是同位素标记的核酸探针与目的核酸杂交后形成抗核酸酶的双链杂合体,用核酸酶消化未杂交的核酸单链后,进行聚丙烯凝胶电泳和放射自显影图谱分析,该方法主要应用于 mRNA 的表达差异检测中(Rebers *et al*,1997; Bozdech *et al*, 2003; Ari-Pekka *et al*,1999)。夹心杂交检测是一种比较常见的核酸检测方法,需要两个探针,即抓捕探针和信号探针,检测时,抓捕探针将目的序列固定到固相介质上,然后用信号探针进行显色。

在双特异分子探针技术中,有一套探针参与反应:抓捕探针、S1 探针、连接探针和信号探针,其中抓捕探针的作用是将目标靶序列(S1 探针)抓捕到固相载体上;S1 探针的作用是与目的靶序列杂交然后作为信息传递体(传递序列信息和数量信息)反映样品信息;连接探针的一端与 S1 探针互补,体现检测特异性,另一端与信号探针互补;信号探针是一段固定的核酸序列,可以用于检测多种藻。

另外在该项技术中,有一种特殊的核酸酶 S1 酶参与反应。S1 酶是单链特异性的核酸内切酶,能够降解单链 DNA 或 RNA;在分子生物学研究领域该酶常用来除去 DNA/DNA 和 DNA/RNA 杂交体中的单链部分。在本研究中,用 S1 酶降解非特异单链 RNA、多余的 DNA 探针以及 DNA/RNA 杂合体中单链 RNA 部分,从而使平滑而稳定的 DNA/RNA 杂合体及其数量体现样品中目的核酸及其含量。

在实际操作中,首先在液相体系中,将长约 60bp 的 S1 探针与待检测微生物的 rRNA 或者细胞裂解液进行杂交,然后加入 S1 酶,降解去除非特异的杂交复合体和过量的 S1 探针,而 S1 探针与目标 rRNA 正确配对形成的 DNA/RNA 双链杂合体被“保留”,而且该双链的量代表了样本中相应的 rRNA 的量;然后进行固相杂交,即被保留的 S1 探针与预先固定于固相基质上约 25bp 的抓捕探针杂交,从而被特异地抓捕固定在固相基质上;接着长约 60bp 的连接探针与被固定的 S1 探针杂交;长约 30bp 的带有特殊标记的信号探针再与连接探针杂交;最后通过化学发光法或者酶联反应获取杂交信号,从而实现对待检测微生物进行定性和定量分析(蔡青松等,2006)。

本实验室将其应用到浮游植物的检测中,对微

小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)和海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)进行检测,获得了良好的结果。在特异性方面,能够检测出两个碱基的差异,说明此方法所用探针具有很高的特异性(Cai *et al*,2006)。

本文设计出一套圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)特异性探针(靶序列为 18S rDNA),结合双特异分子探针技术,建立了圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)的定性定量检测方法。

1 材料与方 法

1.1 研究材料及其培养

本研究中所用藻种为:圆海链藻(*Thalassiosira rotula*)、微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)、塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)、米氏裸甲藻(*Gymnodinium mikimotoi*)、棕囊藻 sp. (*Phaeocystis* sp.)、诺氏海链藻(*Thalassiosira nordenskioldi*)、海链藻 sp.1(*Thalassiosira* sp.1)、角毛藻 sp. (*Chaetoceros* sp.)、直链藻 sp. (*Melosira* sp.)、新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、海链藻 sp.2(*Thalassiosira* sp.2)。藻种经分离纯化后培养于 *f/2* 液体培养基,温度为 18℃,光照强度为 4000 lx,光照周期为 12h/12h。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 及总 DNA 的提取 参照 Rajeshwar 等(2001)的方法经过适当改进后抽提总 DNA,总 RNA 提取采用异硫氰酸胍氯仿酸酚一步法(奥斯伯等,2001)。

1.2.2 18S rDNA 测序与探针设计 本文所用 PCR 引物为真核生物核糖体小亚基通用引物,序列见表 1,PCR 循环条件为 94℃ 预变性 5min,接着 94℃,45s 变性,50℃,45s 退火,72℃,2min 延伸,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 7min。PCR 产物经胶回收后连接到 pMD18-T 载体,转化感受态细胞 DH α -5,用蓝白斑法筛选重组子,经进一步酶切和 PCR 验证为阳性克隆后送 TaKaRa 公司做序列测定,测序引物为 M13-47 和 RV-M,序列见表 1。

将所得序列进行比对,在变异区设计出圆海链藻特异性探针,用 Oligo 6.0 对探针各参数进行评估。引物和探针由上海博亚生物技术公司合成,其中抓捕探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。探针序列如表 1 所示,其中抓捕探针 5 端标记 Biotin,以便与酶标板上的 Streptavidin 结合将抓捕探针固定

表1 本研究中用到的引物和探针
Tab.1 The primers and oligonucleotide probes used in this study

引物和探针		序列
PCR 引物	正向	5 ACCTGGTTGATCCTGCCAGT3
	反向	5 TCACCTACGGAAACCTTG3
测序引物	BcaBEST M13-47	5 CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC3
	BcaBEST RV-M	5 GAGCGGATAACAATTCACACAGG3
双特异分子探针	抓捕探针	5 <u>TGAGGACTCGGGATTGTGGCTT</u> 3
	S1 探针	5 <u>GGACAAGTTCTCGCGGTTCAGGC</u> CCCAATGAAGGAGCC <u>AAGCCACAATCCCGAGTCTCA</u> 3
	连接探针	5 <u>GCCTGACCGCGAGAACTTGTCC</u> <u>TAACAACCTCACCTGCCGAATGAACTAGCCCTG</u> 3
	信号探针	5 <u>CAGGGCTAGTTCATTCGGCAGGTGAGTTGTTA</u> 3

注: 表中标出部分为互补序列

到酶标板上; 信号探针 5 端标记荧光素, 以便与标记有 HRP 的抗荧光素抗体结合, 再用 TMB 显色获得信号。

1.2.3 双特异分子探针技术检测

1.2.3.1 样品与 S1 探针的液相杂交 用裂解液 (80% formamide, 450 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Na₂EDTA, 1% SDS, pH 6.4) 稀释提纯的 RNA 或收集的藻细胞, 超声处理, 加入 1/10 体积 500 nmol/L 的 S1 探针, 于 94°C 变性 15 min, 42°C 杂交 2 h。

1.2.3.2 酶解反应 用同体积的酶切缓冲液 (1.4 mol/L NaCl, 22.5 mmol/L ZnSO₄, 250 mmol/L NaAc, pH 4.5) 稀释 S1 酶 (150 U/μl), 使 S1 酶终浓度为 2 U/μl, 加到液相杂交反应体系中, 混匀, 42°C 酶切 1 h。

1.2.3.3 变性反应 加入 5 倍于裂解液体积的酶切终止液 (62.5 mmol/L NaOH, 30 mmol/L Na₂EDTA, 350 mmol/L Na₂HPO₄, 150 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.2), 94°C 处理 15 min, 自然冷却后用于夹心杂交。

1.2.3.4 微孔板夹心杂交 用 CBS (15 mmol/L Na₂CO₃, 34.9 mmol/L NaHCO₃) 稀释 Streptavidin (购自美国 Promega 公司), 使其终浓度为 5 μg/ml, 100 μl 包被微孔板 4°C 过夜, PBS 洗 3 次; 用生理盐水稀释抓捕探针, 使其终浓度为 4.17 nmol/L, 100 μl 包被微孔板, 37°C 处理 2 h, PBS 洗液洗 3 次, 待用。将 1.2.3.3 中所得反应混合液 100 μl 移入包被有抓捕探针的酶标板微孔中, 50°C 处理 1 h, PBS 洗液洗 3 次; 每孔加入 100 μl 用杂交液 (4×SSC, 0.02% SDS, 10% formamide, 50 mmol/L Tris, pH 7.2) 稀释的连接探针 (8 nmol/L), 50°C 处理 30 min, PBS 洗液洗 3 次; 每孔加入 100 μl 用杂交液稀释的信号探针 (3 nmol/L), 50°C 处理 30 min, PBS 洗液洗 3 次; 每孔加入用生理盐水按 1:6000 稀

释的含标记有辣根过氧化酶的抗荧光素抗体 100 μl, 50°C 处理 20 min, PBS 洗液洗 6 次; 每孔加入 100 μl TMB (1 mmol/L TMB, 200 mmol/L 柠檬酸钾, pH 4.0, 3 mmol/L H₂O₂) 显色液, 50°C 处理 15 min, 每孔加入 50 μl 2 mol/L 硫酸终止反应。用酶标仪于 450 nm 和 630 nm 双波长测定光吸收值。

双特异分子探针技术的检测流程见图 1 所示。

1.2.3.5 建立标准曲线 离心收集一定体积已知浓度的圆海链藻细胞, 加入裂解液, 超声裂解, 将藻细胞裂解液进行倍比稀释, 继续进行杂交实验 (反应过程同上述 4 步反应)。

2 结果

2.1 特异性检验

分别取 5 种甲藻的混合液 (微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*)、海洋原甲藻 (*Prorocentrum micans*)、塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*)、东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*)、米氏裸甲藻 (*Gymnodinium mikimotoi*)、棕囊藻 sp. (*Phaeocystis* sp.)、诺氏海链藻 (*Thalassiosira nordenskioldi*)、海链藻 sp.1 (*Thalassiosira* sp.1)、角毛藻 sp. (*Chaetoceros* sp.)、直链藻 sp. (*Melosira* sp.)、新月菱形藻 (*Nitzschia closterium*)、中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum*)、海链藻 sp.2 (*Thalassiosira* sp.2) 与圆海链藻 (*Thalassiosira rotula*) 进行交叉实验, 其中非目的藻种的细胞浓度均远大于圆海链藻。结果发现, 目的藻种的信号值远远高于非目的藻种 (图 2), 其中非目的藻种中包括海链藻属的其他 3 种藻 (诺氏海链藻和胶州湾分离的两种未定种的海链藻), 说明所设计探针具有种特异性。

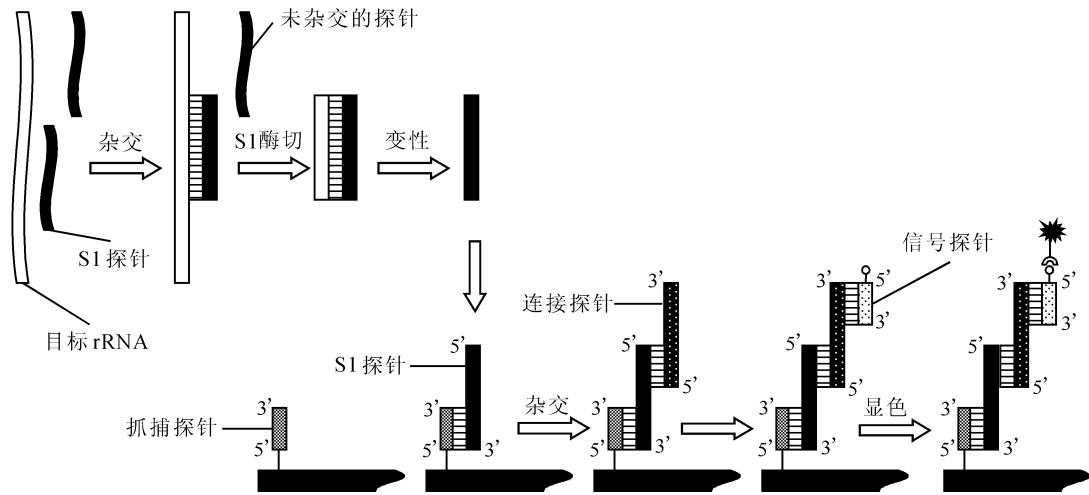


图 1 双特异分子探针技术原理示意图

Fig.1 The schematic of double specific probe assay

2.2 建立标准曲线

以检测信号为纵坐标, 细胞数为横坐标做标准曲线(图 3), 线性范围内检测方程为 $y = 0.0019x -$

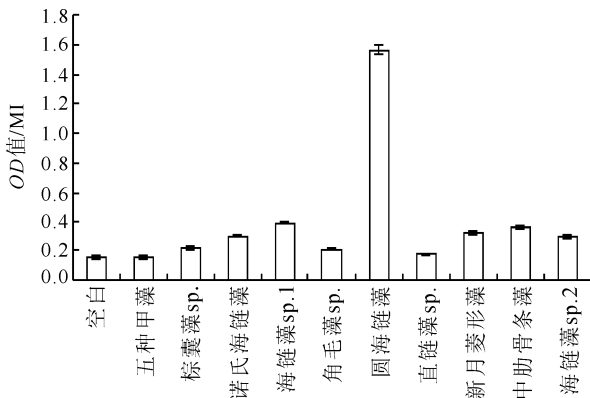


图 2 探针特异性检验

Fig.2 The specificity assay of the probes

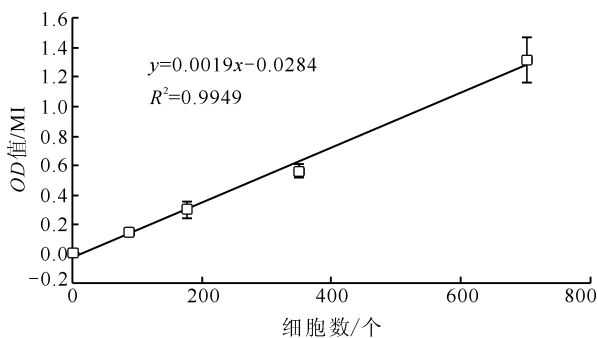


图 3 检测标准曲线(图中的点表示各平行样的平均值, 误差线表示平均值的标准偏差)

Fig.3 The standard curve of double specific probe assay (The dots show the mean values and error bars represent the standard deviations of the parallel samples)

0.0284, $R^2 = 0.9949$, 并且批内标准偏差($n=4$)较小(图 3), 最低可检测到 88 个目的藻细胞。

2.3 模拟样品检测

对于海藻样品的检测, 取圆海链藻(*Thalassiosira rotula*), 首先用显微镜进行计数, 剩余部分再均分为两份, 一份用 300 ml *f/2* 培养基稀释, 然后收集进行杂交检测; 另一份用 300 ml 天然海水稀释, 收集进行杂交检测, 根据所得信号值, 按照 2.2 所得标准方程计算出细胞数量。每个样品检测设定 4 个平行样品, 应用 SPSS 统计学软件对 3 种计数结果分别进行 *T*-检验和方差分析, 发现 3 种结果无显著差异(表 2)。

2.4 细胞裂解液直接进行杂交与提纯后 RNA 杂交的比较

收集圆海链藻细胞, 采用异硫氰酸胍氯仿酚一步法抽提 RNA, 用裂解液稀释提纯的 RNA 做杂交实验, 将所得结果与直接用细胞裂解液杂交的结果进行比较, 发现用细胞裂解液直接杂交检测所得信号值要明显高于提纯 RNA 检测所得的信号值, 而且提纯 RNA 组的标准偏差要明显高于细胞裂解液组(图 4)。

3 讨论

本文中作者采用的核心技术为双特异分子探针技术, 整个实验过程中, 直接与 rRNA 分子相关的过程只有 S1 酶保护分析探针与 rRNA 分子杂交这一步, 只要杂交裂解液加入适当的 RNA 酶抑制剂就能保证杂交时 rRNA 分子不被降解或很少被降解, 实验操作的其他步骤都是针对稳定的寡核苷酸分子进行的, 相对比较容易执行, 因而具有较好的稳定性。另外, 适量浓度的 S1 酶能够降解双链核酸中的单链部分以

表2 海藻模拟样品显微镜计数与双特异分子探针技术计数结果比较
Tab.2 The comparison between results obtained by microscope and double specific probe assay

样品	显微镜计数结果	本方法检测结果(<i>f/2</i> 培养基稀释)	本方法检测结果(天然海水稀释)
样品 1	100852±6557	103671±3408	109895±7909
样品 2	86445±5621	80618±2246	80700±6468
样品 3	72038±4684	72367±7776	68456±13081

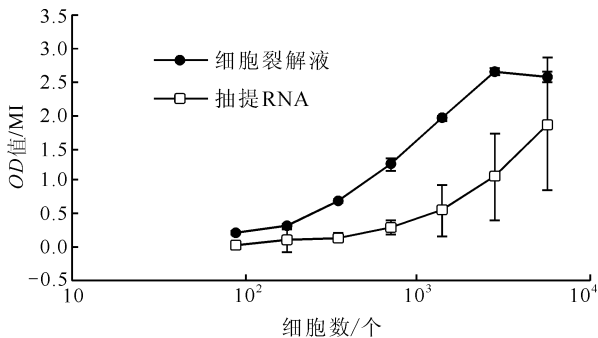


图4 细胞裂解液直接进行杂交与提纯后 RNA 杂交的比较
(图中各点表示各平行样的平均值, 误差线表示平均值的标准偏差)

Fig.4 The comparison between extracted total RNA and crude cell lysate as sample material in the hybridization assay (The dots show the mean values and error bars represent the standard deviations of these means)

及错配部分, 因而由非特异性错配产生的噪音大大降低。

与传统的夹心杂交技术相比, 本技术具有较好的特异性和灵敏度。在特异性检测方面, 该技术具有种特异性。在检测过程中, 从三个层次来保证检测特异性, 首先是探针的设计, 即尽量在与其他物种核酸序列差异较大的区域寻找探针; 然后是杂交条件的控制, 其中包括杂交温度、盐离子浓度和 pH 等; 第三个层次为本技术所特有, 即 S1 酶的酶切特性, 在适当的使用浓度下, S1 酶不仅能够有效地降解单链核酸, 还能有效地降解错配的双链核酸, 这样就降低了由非特异性杂交而产生的干扰, 与传统的夹心杂交相比, 大大提高了杂交特异性。在灵敏度方面, 本技术在杂交过程中多是较稳定的 DNA 探针小分子进行反应, 降低了由 RNA 降解而引起的信号损失。另外, 小分子“位阻”小, 杂交效率高, 从而也提高了灵敏度。

为使检测过程更加简便快捷, 该实验舍去抽提 RNA 这一步烦琐而复杂的过程, 图 4 中显示了细胞裂解液直接进行杂交与提纯后 RNA 杂交的比较, 结果发现, 数量相同的细胞直接进行裂解杂交的信号

要明显高于抽提 RNA 后进行杂交的信号, 而且用抽提后 RNA 进行杂交所得到的信号十分不稳定, 这可能是由于 RNA 的提取效率不稳定造成的。该实验表明, 用细胞裂解液直接进行杂交可以得到更佳效果, 既省略了烦琐的 RNA 提取过程, 又得到了更加稳定的杂交信号。

本技术最低可检测到 88 个目的藻细胞, 在进行样品检测时, 取适量体积的自然海水进行过滤富集后, 即可用该技术进行检测分析。应用该检测技术所得到的标准曲线具有很好的相关性, 且样本偏差较小, 表 2 显示了用双特异分子探针技术检测结合标准方程计算出的结果与显微镜检测结果基本一致, 并且用天然海水稀释后检测所得到的结果与直接用 *f/2* 培养基稀释后检测的结果基本一致, 说明天然海水中其它浮游生物的存在对该检测无显著影响。所以该技术有望进一步用于自然海区样品的检测。

致谢 本研究所所用部分藻种由中国科学院海洋研究所孙军博士、暨南大学吕颂辉教授和美国康涅狄格大学林森杰博士提供, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王 波, 米铁柱, 吕颂辉等, 2006. 五种/株原甲藻核糖体小亚基(18S rRNA)基因克隆及序列分析. 海洋与湖沼, 37(5): 450—456
- 向军俭, 朱小兵, 吕颂辉等, 2003. 五种赤潮藻单克隆抗体的制备. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 24(3): 103—108
- 庄 丽, 陈月琴, 李钦亮等, 2001. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析. 海洋与湖沼, 32(2): 148—153
- 米铁柱, 甄 毓, 于志刚等, 2003. 海洋浮游藻类检测技术发展及展望. 高技术通讯, 13: 96—100
- 齐雨藻, 2003. 中国沿海赤潮. 北京: 科学出版社, 37
- 张宝玉, 王广策, 张 炎等, 2004. 东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM)的 5.8S rDNA 及其转录间隔区(ITS)的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 35(3): 264—272
- 陈月琴, 王 宁, 周 惠等, 2002. 棕囊藻赤潮原因种的分子鉴定和起源分析. 海洋学报, 24(6): 99—103
- 陈月琴, 屈良鹄, 曾陇梅等, 1999. 南海赤潮有害甲藻——链状塔玛亚历山大藻的分子鉴定. 海洋学报, 21(3):

- 106—111
- 姚 鹏,于志刚,米铁柱等, 2003. 海洋浮游藻类的化学分类法. 海洋环境科学, 22(1): 75—80
- 黄邦钦, 陈纪新, 焦念志等, 2003. 原位荧光杂交和特异性寡核苷酸探针检测亚历山大藻属(*Alexandrium*)和塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的探索. 高技术通讯, 13: 90—95
- 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E 等, 2001. 颜子颖译, 2001. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 125
- 蔡青松, 李荣秀, 甄 毓等, 2006. 用双特异探针技术定性和定量分析微型原甲藻. 海洋学报, 28(6): 127—133
- Adrianna I, Antonio M, Serge A P *et al*, 2004. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature*, 429: 403—407
- Ari-Pekka K, Anne L, Malin S *et al*, 1999. Complete exon-intron organization and chromosomal location of the gene for mouse type XIII collagen(coll3a1) and comparison with its human homologue. *Matrix Biology*, 18: 261—274
- Bowers H A, Tengs T, Glasgow B *et al*, 2000. Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl Environ Microbiol*, 66(11): 4641—4648
- Cai Qingsong, Li Rongxiu, Zhen Yu *et al*, 2006. Detection of two *Prorocentrum* species using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay. *Harmful Algae*, 5(3): 300—309
- Eschbach E, Reckermann M, John U, 2001. A simple and highly efficient fixation method for *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophytes) for analytical flow cytometry. *Cytometry*, 44: 126—132
- Giulianad I, Olimpia I, Romano G *et al*, 2002. Detection of short-chain aldehydes in marine organisms: the diatom *Thalassiosira rotula*. *Tetrahedron Letters*, 43: 6137—6140
- Kwan W C, Kim W C, 2003. HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong. *Chemosphere*, 52(9): 1633—1640
- Miller P E, Scholin C A, 2000. On detection of *Pseudo-nitzschia* species using rRNA-targeted probes: sample fixation and stability. *Journal of Phycology*, 36: 238—250
- Miralto A, Barone G, Romano G *et al*, 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402: 173—176
- Rajeshwar P S, Margit D, Donat P H *et al*, 2001. A simple and efficient method for the quantitative analysis of thymine dimmers in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Acta Protozool*, 40: 187—195
- Rebers J E, Niu J, Riddiford L M, 1997. Structure and Spatial Expression of the *Manduca sexta* MSCP14.6 cuticle gene. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(3): 229—240
- Scholin C A, Anderson D M, 1998. Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives. In: Regura B, Blanco J, Fernandez M L *et al* ed. Vigo and Paris: Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 253—257
- Scholin C A, Marin R, Miller P E *et al*, 1999. Application of DNA probes and a receptor binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (*Bacillariophyceae*) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *Journal of Phycology*, 35: 1356—1367
- Simon N, Brenner J, Edvardsen B, 1997. The identification of *Chrysochromulina* and *Prymnesium* species (*Haptophyta*, *Prymnesiophyceae*) using fluorescent or chemiluminescent oligonucleotide probes: a means for improving studies on toxic algae. *Eur J Phycol*, 32: 393—401
- Tengs T, Bowers H A, Ziman A P *et al*, 2001. Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and development of a molecular detection assay. *Molecular Ecology*, 10: 515—523
- Tyrrell J V, Bergquist P R, Bergquist P L *et al*, 2001. Detection and enumeration of *Heterosigma akashiwo* and *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Phycologia*, 40(5): 457—467
- Vrieling E G, Anderson D M, 1996. Immunofluorescence in phytoplankton research: applications and potential. *Journal of Phycology*, 32: 1—16
- Xin Zeyu, Yu Zhigang, Wang Tanchun *et al*, 2005. Identification and quantification of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. with competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA). *Harmful Algae*, 4(2): 297—307

DETECTION AND QUANTIFICATION OF *THALASSIOSIRA ROTULA* WITH DOUBLE SPECIFIC PROBE ASSAY

LI Xiu-Qin¹, YU Zhi-Gang², ZHEN Yu², CAI Qing-Song³, MI Tie-Zhu⁴, LI Rong-Xiu⁵

(1. Marine Life Sciences College, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

2. Chemistry and Chemical Engineering College, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

3. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031;

4. Environmental Science and Engineering College, Ocean University of China, Qingdao, 266003;

5. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200030)

Abstract A double specific probe assay was applied to detect and quantify *Thalassiosira rotula*, a common species of harmful algae bloom, in which a set of oligonucleotide probes targeting 18S rRNA was used. The probes are species-specific, without obvious incident cross-reactivity with other species. Results of detection on the same number of cells to crude cell lysate and extracted total RNA were compared, showing that the former was better. A preliminary test was made on natural samples, and the noise produced by complex field background was minimal.

Key words *Thalassiosira rotula*, Double specific probe assay, Harmful algae detection