

文章编号:1000-0615(2007)02-0193-06

赤潮研究中圆海链藻实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

何闪英¹, 吴小刚²

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003;

2. 浙江大学生工食品学院, 浙江 杭州 310029)

摘要:为建立快速、准确的鉴定和定量检测赤潮生物的方法,以圆海链藻为例,以其 18S rDNA 序列为寻找种特异性引物的靶区域,通过分析 18S rDNA 序列,设计出适合用于 RFQ-PCR 的引物与探针,并通过引物 PCR 验证确定其特异性,进而以圆海链藻荧光定量 PCR 的引物和探针(Primer *Thalassiosira rotula* 和 Taqman *Thalassiosira rotula*),建立了定量检测圆海链藻的实时荧光定量 PCR 检测方法(RFQ-PCR)。与传统的显微镜计数方法比较,两者所获结果无显著性差异,证明了本方法的可行性,从而为我国沿海水域赤潮问题的研究提供了良好的技术检测途径。

关键词:赤潮;圆海链藻;荧光定量 PCR;核糖体小亚基 DNA

中图分类号:X 855

文献标识码:A

Development of a real-time PCR method for rapid detection of *Thalassiosira rotula*

HE Shan-ying¹, WU Xiao-gang²

(1. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Biotechnology and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Red tide is a global marine environment problem, and it seriously endangers the aquaculture and marine ecology, so to identify the red tide species quickly and exactly, and detect the species quantitatively have been the key to forecast and prevent red tide. While the traditional micro-phytoplankton detection methods are time consuming and laborious, which can be difficult for long-term monitoring. To establish a correct and rapid identifying and quantitative detection method, in this study, red tide alga *Thalassiosira rotula* was taken as the object, the gene specific primers and DNA probe were designed based on the sequence of 18S rDNA isolated from *T. rotula*. Real-time fluorescent quantitative PCR (RFQ-PCR) method was developed for quantitative detection of *T. rotula*. The results of RFQ-PCR detection largely agreed with those of microscope counting method, which suggested that the RFQ-PCR could be served as a useful method for red tide algae detection.

Key words: red tide; *Thalassiosira rotula*; fluorescent quantitative PCR; 18S rDNA

收稿日期:2006-04-17

作者简介:何闪英(1980-),女,浙江东阳人,博士研究生,主要从事赤潮生物的分子生态学研究

通讯作者:吴小刚, Tel:0571-88215678, E-mail:wxg1669@zju.edu.cn

近年来,赤潮已成为沿海地区的重要环境问题,随着河口、内湾和沿岸水域污染不断加剧,水体富营养化程度日趋严重,赤潮发生的频率和危害程度明显上升。我国是赤潮发生较多的国家之一,其中广东、浙江、山东、辽宁和上海近海,长江口、珠江口、辽东湾、渤海湾、莱州湾、杭州湾、大亚湾等海域都是赤潮的多发区。自 20 世纪 70 年代开始,中国海域赤潮的发生以每十年增加 3 倍的速度不断上升^[1]。

圆海链藻 (*Thalassiosira rotula*) 属浮游硅藻,海链藻属,属世界范围分布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,被列入中国沿岸赤潮生物种类名录^[2]。圆海链藻增殖速度快,并且能够产生一些短链的醛类物质,从而抑制桡足类生物卵的发育^[3],圆海链藻引发的赤潮能够影响桡足类的种群结构,这也是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及其数量,了解其在海区的种群动态,对海洋生态环境及赤潮监测研究具有重要意义。

赤潮生物种类的识别与鉴定是赤潮预报预测及其防治的关键。但在赤潮发生的早期,自然水体中赤潮生物的细胞密度相对较低,且赤潮藻个体微小,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,毒性试验等。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鉴定^[4]。因此如何利用先进的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学研究的热点之一,也是海洋水质检测特别是实现赤潮监测和预警亟待解决的问题。

基于种属间基因的多样性^[5-6],近几十年来无论在水体还是沉积物中分子技术已经成为微生物检测的重要手段^[7-9],其中 PCR 方法已成功应用于多种水体产毒素甲藻的检测^[10-12]。实时荧光定量 PCR 技术的出现,以其特异性强、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。本文以圆海链藻为研究对象,以 18S rDNA 序列为特异性探针,建立了圆海链藻的实时荧光定量 PCR 检测新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的微藻藻种见表 1。其中圆海链藻系本研究的目标藻,其他藻用于检验方法的特异性。微藻在实验室中用常规的 F/2 培养基培养至对数生长期,培养条件:光照/黑暗周期为 12 h/12 h,光照强度为 4 000 lx,培养温度为 22 ~ 25 °C。

表 1 藻种名称及培养至对数生长期时的浓度

Tab. 1 The microalgal names and the cell densities in their exponential stage

藻种名 algae name	细胞浓度 (mL ⁻¹) cell density	来源 algal source
旋链角毛藻 (<i>Chaetoceros curvisetus</i>)	4.8 × 10 ⁷	胶州湾 Jiaozhou Bay
柔弱角毛藻 (<i>Chaetoceros debilis</i>)	3.2 × 10 ⁶	胶州湾 Jiaozhou Bay
纤细角毛藻 (<i>Chaetoceros gracile</i>)	6.8 × 10 ⁶	胶州湾 Jiaozhou Bay
微型角毛藻 (<i>Chaetoceros minimum</i>)	3.4 × 10 ⁷	胶州湾 Jiaozhou Bay
膜质舟形藻 (<i>Navicula membranacea</i>)	4.4 × 10 ⁵	胶州湾 Jiaozhou Bay
新月菱形藻 (<i>Nitzschia closterium</i>)	1.2 × 10 ⁶	胶州湾 Jiaozhou Bay
裸甲藻 (<i>Gymnodinium</i> sp.)	5.1 × 10 ⁵	胶州湾 Jiaozhou Bay
米氏裸甲藻 (<i>Gymnodinium mikimotoi</i>)	1.5 × 10 ⁶	胶州湾 Jiaozhou Bay
直链藻 (<i>Melosira</i> sp.)	1.4 × 10 ⁵	胶州湾 Jiaozhou Bay
尖刺拟菱形藻 (<i>Pseudonitzschia pungens</i>)	1.6 × 10 ⁴	胶州湾 Jiaozhou Bay
中肋骨条藻 (<i>Skeletonema costatum</i>)	3.8 × 10 ⁶	胶州湾 Jiaozhou Bay
亚历山大藻 (<i>Alexandrium</i> sp.)	1.8 × 10 ⁴	大鹏湾 Dapeng Bay
赤潮异弯藻 (<i>Heterosigma akashiwo</i>)	2.3 × 10 ⁴	大连湾 Dalian Bay
微小原甲藻 (<i>Prorocentrum minimum</i>)	1.1 × 10 ³	渤海湾 Bohai Bay
圆海链藻 (<i>Thalassiosira rotula</i>)	2.2 × 10 ⁵	胶州湾 Jiaozhou Bay

1.2 DNA 提取

DNA 提取参照 Rajeshwar 等^[13]的方法并加以改进。对数生长期的藻准确计数 (表 1),

10 000 r · min⁻¹离心收集,加 200 μL TE 缓冲液 (10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol · L⁻¹ EDTA pH 8.0),加入 2 倍体积的预热至 55 °C 的

抽提缓冲液 [3% (w/v) CTAB, 1% (w/v) Sarkosyl, 20 mmol · L⁻¹ EDTA, 1.4 mol · L⁻¹ NaCl, 0.1 mol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol], 55 °C 处理 1 h, 其间每隔 10 min 颠倒混匀一次; 取出后于 4 °C 冰箱静置 3 min, 加入 800 μL 氯仿: 异戊醇 (24:1) 颠倒混匀至成乳浊状, 10 000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 10 min, 取上相溶液加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 混匀, 10 000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 10 min; 之后的操作同常规的 DNA 提取^[14]。提取的 DNA 溶于 50 μL TE 缓冲液中。

1.3 克隆测序

从圆海链藻总 DNA 中取 1 μL 加入 49 μL 的 PCR 反应液中 (在 50 μL 的反应体系中包括 50 mmol · L⁻¹ 氯化钾, 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol · L⁻¹ 氯化镁, 0.2 mmol · L⁻¹ dNTP, 0.5 U *Taq* 酶, 正反向引物各 3 μmol · L⁻¹) 进行第一轮 PCR。其中正向引物的序列是 5'-gct cgn mwy war grt taa gcc atg c-3', 反向引物的序列为 5'-cct tgg tcc gtg ttt caa ga-3'。PCR 程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。将所得的 PCR 产物用上海华舜公司的 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 取 1 μL 加入如上所述的 PCR 反应体系中进行第二轮 PCR。此轮 PCR 所用的引物分别是: 5'-cct ttg tac aca ccg ccc-3' (正向), 5'-cac ggt act tgt wyr cta tcg gt-3' (反向)。PCR 程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。第二轮 PCR 产物胶回收后与 TaKaRa pMD18-T Vector 连接, 转化入大肠杆菌 DH5-α 中, 挑取阳性菌落培养, 提纯质粒测序。

1.4 引物设计及其特异性验证

用 DNASTar 软件对测得的序列与从 GenBank 上获得的同源序列进行比对分析, 选择圆海链藻的 18S rDNA 区域中与其它浮游植物有显著差异的区域, 用 Primer Premier 5.0 设计出适合于 RFQ-PCR 的引物和探针 (Primer *T. rotula* 和 Taqman *T. rotula*)。用这对引物对不同浮游植物进行 PCR 扩增, 体系为: 双蒸水 36.75 μL, 10 × *Taq* 酶缓冲液 5 μL, dNTP 混合液 (2.5 mmol · L⁻¹) 4 μL, 氯化镁 (25 mmol · L⁻¹) 2 μL, *Taq* 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.25 μL, Primer *T. rotula* 正向引物 (30 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, Primer *T. rotula* 反向引

物 (30 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, 模板 1 μL; PCR 程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。

1.5 实时荧光定量 PCR 方法的建立

根据上述方法中的引物特异性验证结果合成 Taqman 探针, 建立圆海链藻属的实时荧光定量 PCR 方法。Taqman 探针 5' 端用 FAM 标记, 3' 端用 TAMRA 标记。用 Bioer Line-gene FQD-33A (博日, 日本) 进行荧光定量 PCR 反应, 体系为: 双蒸水 22.1 μL, 10 × *Taq* 酶缓冲液 10 μL, dNTP 混合液 (各 2.5 mmol · L⁻¹) 6 μL, 氯化镁 (25 mmol · L⁻¹) 8 μL, *Taq* 酶 (0.5 U · μL⁻¹) 0.5 μL, Primer *T. rotula* 正反向引物 (20 μmol · L⁻¹) 各 1 μL, Taqman *T. rotula* (20 mmol · L⁻¹) 0.4 μL, 模板 1 μL; PCR 程序: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 50 s, 40 个循环。

按 1.2 所述方法提取圆海链藻 DNA, 按 1:10 倍比稀释, 设 6 个稀释度。然后取 1 μL DNA 溶液进行实时荧光定量 PCR, 每个稀释度重复测量 3 次。以显微镜计数获得的细胞数之对数值为横坐标, 以实时荧光定量 PCR 反应中相应的 CT 值为纵坐标, 绘制标准曲线。

2 结果

2.1 测序结果

测得长度为 1 887 bp 的 18S rDNA 序列。所测得的序列与 NCBI 上的圆海链藻序列 (AF374480) 相似度为 99%。

2.2 引物的设计与特异性验证

Primer *T. rotula* 的序列为: 5'-ttg tgg ctt ggc tcc ttc att-3', 5'-ttg tta cga ctt cac ctt cct cta a-3', Taqman *T. rotula* 序列为: 5'-ggc ctg acc gcg aga act tgt ccg-3', 用 Primer *T. rotula* 引物对不同藻种的常规 PCR 扩增结果如图 1。从图 1 可知, Primer *T. rotula* 仅对圆海链藻有 83 bp 的特异性扩增, 而对其它 14 种藻无扩增条带, 可知此引物对圆海链藻是特异的。

2.3 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

以不同密度的圆海链藻提取的 DNA 溶液及 Primer *T. rotula* 和 Taqman *T. rotula* 进行荧光定量 PCR 检测, 结果如图 2 所示。每个稀释度重复测量 3 次 (各个稀释度 DNA 溶液测得的 C_T 值见表 2), 用测得的 C_T 值对细胞密度的对数值作图, 见

图3。回归的曲线方程为 $y = -3.4857x + 40.174$, 其中 x 为细胞数对数值, y 为 C_T 值, 其回归系数: $R^2 = 0.9962$ 。

2.4 荧光定量 PCR 方法的验证

圆海链藻样品计数后用 1 mL 混合藻稀释, 再用荧光定量 PCR 测定。根据实测的 G 值, 再通过

标准曲线推算检测样品中的细胞数(表3)。统计分析表明, 在 $P = 0.05$ 时, 用镜检和 RFQ-PCR 推算两种方法得到的细胞数没有显著性差异, 用本文建立的 RFQ-PCR 方法检测圆海链藻是可靠的。

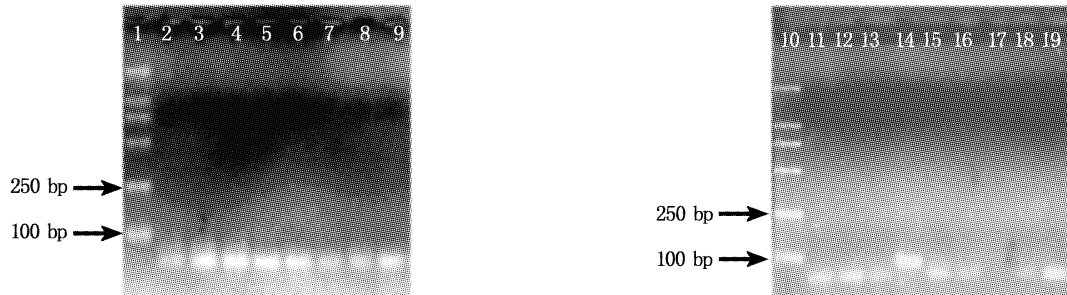


图1 PCR 验证 Primer *T. rotula* 对圆海链藻的特异性

Fig. 1 Test of the specificity of the Primer *T. rotula*

1, 10. 2000 bp DNA ladder plus (从上到下条带大小: 2000 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp); 2. 尖刺拟菱形藻; 3. 旋链角毛藻; 4. 柔弱角毛藻; 5. 纤细角毛藻; 6. 微型角毛藻; 7. 米氏裸甲藻; 8. 裸甲藻; 11. 赤潮异湾藻; 12. 塔玛亚历山大藻; 13. 新月菱形藻; 14. 圆海链藻; 15. 中肋骨条藻; 16. 微小原甲藻; 17. 直链藻; 18. 膜质周形藻; 9, 19. H_2O

Lane 1, 10. 2000 bp DNA ladder plus (from the top down, the size of each bank is 2000 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp); Lane 2. *P. pungens*; Lane 3. *C. curvisetus*; Lane 4. *C. debilis*; Lane 5. *C. gracile*; Lane 6. *C. minimum*; Lane 7. *G. mikimotoi*; Lane 8. *G. sp.*; Lane 11. *H. akashiwo*; Lane 12. *A. tamarens*; Lane 13. *N. closterium*; Lane 14. *T. rotula*; Lane 15. *S. costatum*; Lane 16. *P. minimum*; Lane 17. *Melosira sp.*; Lane 18. *N. membranacea*; Lane 9, 19. H_2O

表2 标准稀释样品多次测得的 RFQ-PCR 结果

Tab. 3 The RFO-PCR results of diluted microalgae

稀释倍数 dilution serial	1:10 ⁰	1:10 ¹	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴
对应细胞数 (μL^{-1} DNA) corresponding cell number	1.1×10^6	1.1×10^5	1.1×10^4	1.1×10^3	1.1×10^2
第1次测 C_T 值 C_T value for the first time	18.95	22.36	25.8	29.94	33.93
第2次测 C_T 值 C_T value for the second time	19.61	22.53	25.4	29.03	32.94
第3次测 C_T 值 C_T value for the third time	19.74	22.64	25.9	29.07	33.46
平均 C_T 值 average C_T value	19.43	22.51	25.7	29.35	33.44

3 讨论

浮游植物在海洋生态环境中占据重要地位, 传统检测方法, 如光学显微镜和电镜观察, 仅能从形态上进行分析, 而从 DNA 保守序列角度进行分析, 并建立快速鉴定和定量监测技术, 是环境生物研究的热点。由于 rDNA 基因的高保守

性^[15-16], 其大小亚基、5.8S 区, ITS1 和 ITS2 区都经常被选作 PCR 扩增区域, 目的区域的选择主要考虑其在研究物种中的变异程度及特异性和灵敏性的要求^[17-19]。这在区分形态上极为相近或者形态变化较大的浮游植物, 特别是区分一些形态上很难区分的种类时具有重要价值, 已成为传统形态学分类十分有效的补充方法^[10]。

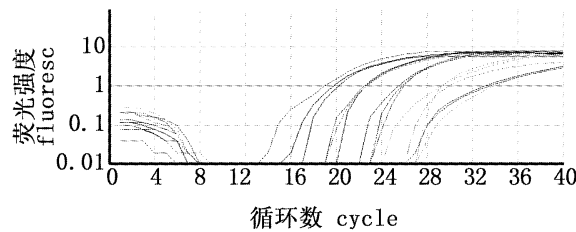


图2 各稀释度 DNA 溶液荧光信号曲线

Fig. 2 The RFQ-PCR results of diluted DNA solutions 图中横坐标为循环数,纵坐标为荧光强度,与横坐标平行的直线为荧光阈值。曲线为圆海链藻不同细胞浓度下的荧光信号变化,每个浓度分别上样3次

The abscissa was cycle number, the ordinate was fluorescence. The curves are the fluorescence corresponding to the different DNA dilution of *T. rotula*, each concentration was detected 3 times

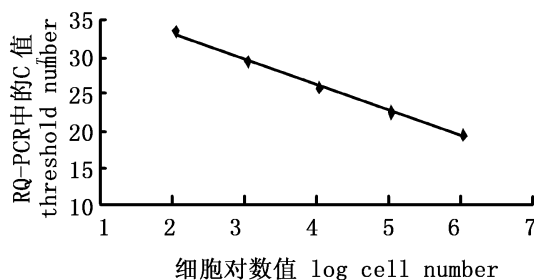


图3 RFQ-PCR 定量计数圆海链藻的标准曲线

Fig. 3 The standard curve for detection of *T. rotula* by RFQ-PCR

表3 RFQ-PCR 方法和显微镜计数法结果的比较

Tab. 3 The comparison for the RFQ-PCR method and microscope counting method

样品序号 sample	RFQ-PCR 推算的细胞数 cell number by RFQ-PCR method	LM 镜检细胞数 cell number counted by LM	t 检验结果, $t_{\text{临界}} = 4.30$, ($P = 0.05$, $n = 3$) analysis of statistics
1	$(1.55 \pm 0.20) \times 10^6$	$(1.97 \pm 0.11) \times 10^6$	$ t = 2.22 < t_{\text{临界}}$
2	$(3.77 \pm 0.78) \times 10^5$	$(3.13 \pm 0.20) \times 10^5$	$ t = 1.15 < t_{\text{临界}}$
3	$(1.59 \pm 0.08) \times 10^5$	$(1.42 \pm 0.04) \times 10^5$	$ t = 3.76 < t_{\text{临界}}$
4	$(4.94 \pm 0.85) \times 10^3$	$(3.07 \pm 0.38) \times 10^3$	$ t = 4.13 < t_{\text{临界}}$

现今发现的由圆海链藻引发的赤潮虽然不产生赤潮毒素,但其发生频率越来越高,对海洋水产养殖的危害及海洋生态环境的影响越来越大,因此对其进行准确的预报预测具有十分重要的意义。对于待测样品,本文所述的方法特异性好,操作简便,整个过程4 h内可全部完成,这使得大样本的检测成为可能,为实现海区中圆海链藻的动态监测和深入研究其生消机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 名江,朱明远,张经. 中国赤潮的发生趋势和研究进展[J]. 生命科学, 2001, 13(2): 54-60.
[2] 齐雨藻. 中国沿海赤潮[M]. 北京: 科学出版社,

根据圆海链藻的 rDNA 的部分区域设计引物与探针,由于具有良好的保守性,而在种间尤其是属间差异性大,可作为该物种特异性的遗传标记。以 rDNA 区域序列作为研究的靶区域建立的荧光定量 PCR 方法,检测圆海链藻,准确可靠,特异性好。

发生赤潮时圆海链藻一般的浓度为 $1 \times (10^4 \sim 10^6) \text{ mL}^{-1}$, 本文建立的方法可检测含有圆海链藻 $1.1 \times (10^2 \sim 10^7) \text{ mL}^{-1}$ 的水样,完全满足水体发生赤潮时检测范围,对于低浓度的水体 ($< 100 \text{ mL}^{-1}$ 的水体),需要通过改善实验体系以提高检测限。例如,可以通过提高 DNA 提取效率来实现,尽量减少 DNA 提取过程中 DNA 的损失,包括减少操作步骤,提高细胞裂解程度, Foulds 等^[20] 研究表明,用不同的提取方法得到的 DNA 提取物分别作荧光定量 PCR,其结果具有很大差异。尽量去掉细胞裂解物中的荧光定量 PCR 抑制物,优化荧光定量 PCR 条件,包括反应体系的组成,引物和 Taqman 探针序列的调整,反应程序的优化等,也是一些可以尝试的方法。

2003:37.

- [3] Adrianna I, Antonio M. Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom [J]. Nature, 2004, 429: 403-407.
[4] Rehnstam-Holm A S, Godhe A, Anderson A M. Molecular studies of Dinophysis (Dinophyceae) species from Sweden and North America [J]. Phycologia, 2002, 41: 348-357.
[5] La Jeunesse T C. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a "species" level marker [J]. J Phycol, 2001, 37: 866-880.

- [6] Moon-van S, Wachter R D, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity[J]. *Nature*, 2001, 409:607-610.
- [7] 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]. *Protistologica*, 2002, 153:223-238.
- [8] 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 Environ Microbiol*, 2002, 68:5394-5407.
- [9] 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.
- [10] Bowers H A, Tengs T, Glasgow Jr H B, *et al.* Development of real-time PCR assays for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related Dinoflagellates [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:4641-4648.
- [11] Godhe A, Otta S K, Rehnstam-Holm A S, *et al.* Polymerase chain reaction in detection of *Gymnodium mikimotoi* and *Alexandrium minutum* in field samples from southwest India [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3:152-162.
- [12] Rollo F, Sassaroli S, Boni L, *et al.* Molecular typing of the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* in phytoplankton suspensions [J]. *Aqua Micro Ecol*, 1995, 9:55-61.
- [13] Rajeshwar P S, Margit D, Donat P H. A simple and efficient method for the quantitative analysis of thymine dimers in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae[J]. *Acta Protozoologica*, 2001:40,187-195.
- [14] 颜子颖(译). 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998:30-38.
- [15] Medina 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 Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:9707-9712.
- [16] Medlin L, Elwood H J, Stickel S, *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA coding regions. *Gene* 71: 491-499. Acid activity in cultured and natural samples[J]. *J Phycol*, 1988, 35:1356-1367.
- [17] Connell L. Rapid identification of marine algae (Raphidophyceae) using three-primer PCR amplification of nuclear internal transcribed spacer (ITS) regions from fresh and archived material [J]. *Phycologia*, 2002, 41:15-21.
- [18] Giacobbe M G, Penna A, Ceredi A, *et al.* Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta)[J]. *Phycologia*, 2000, 39:177-182.
- [19] Marin I, Aguilera A, Reguera B, *et al.* Preparation of DNA suitable for PCR amplification from fresh or fixed single dinoflagellate cells [J]. *Bil Techniques*, 2001, 30:88-93.
- [20] Foulds I V, Granacki A, Xiao C, *et al.* Quantification of microcystin-producing cyanobacteria and *E. coli* in water by 5'-nuclease PCR[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 93:825-834.