

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00898

贝类派琴虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法的建立

谢芝勋 谢丽基 庞耀珊 刘加波 邓显文 谢志勤

(广西兽医研究所, 南宁 530001)

摘要: 根据基因库中派琴虫和折光马尔太虫基因序列, 设计了两对特异性引物和两条用不同荧光基团标记的 TaqMan 探针。对反应条件和试剂浓度进行优化, 建立了能够同时检测派琴虫和折光马尔太虫的二重荧光定量 PCR 方法。该方法对派琴虫和折光马尔太虫的检测敏感性达到 40 个模板拷贝数; 对派琴虫和折光马尔太虫不同浓度模板进行组合, 该方法仍可有效同时检测出这二种原虫。研究建立的派琴虫和折光马尔太虫荧光定量 PCR 具有特异、敏感、快速、定量和重复性好等优点, 可用于临床上派琴虫和折光马尔太虫感染的检测。

关键词: 派琴虫; 折光马尔太虫; 二重荧光定量 PCR

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)05-0898-07

随着养殖规模的日益扩大及密度的持续增高, 贝类的病害也频繁出现。目前, 危害最严重的贝类原虫有派琴虫(*Perkinsus* sp.)和折光马尔太虫(*Marteilia refringens*)。派琴虫能使贝壳不能闭合, 套膜收缩, 性腺发育抑制, 生长缓慢, 偶尔也会出现脓肿, 死亡率可高达 95%^[1-4]。马尔太虫可引起贝类消瘦, 消化道变色, 生长停止, 甚至死亡^[5,6]。

派琴虫和折光马尔太虫的传统检测方法有电镜观察、组织细胞学检查、原位杂交和雷氏液体硫酸盐培养基(RFTM), 这些方法费时费力, 缺乏专一性, 在实际工作中具有一定的局限性^[7-10]。病原检测、筛选建立无特定病原体的健康群, 仍然是目前预防与控制这些原虫病的最有效办法。荧光定量 PCR 将 PCR 与荧光检测方法相结合, 具有操作简便、结果直观、灵敏度高、特异性强和重复性好等优点, 已成为动物病原检测的重要方法^[11,12]。迄今为止, 还未见应用多重荧光定量 PCR 技术对贝类原虫病进行检测和诊断的报道。为了提高派琴虫和折光马尔太虫检测的准确性和检测效率, 缩短检测周期, 本研究设计多对引物, 建立了派琴虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Lightcycler2.0 荧光定量 PCR 仪(Roche)。质粒小量提取试剂盒购自北京 BioDev 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒及 pMD18-T 载体试剂盒购自大连宝生物公司; DNA 片段胶回收试剂盒购自 BioDev 公司; 海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根公司。

1.2 菌株和 DNA

嗜水气单胞菌和荧光假单胞菌均购自中国农业部动植物病原库; 派琴虫、折光马尔太虫、副溶血弧菌、溶藻弧菌、河弧菌和拟态弧菌由本室保存; 单孢子虫 DNA 由美国维吉尼亚海洋科学研究所的 Nancy Stokes 惠赠。

1.3 荧光定量 PCR 方法的建立

引物与 Taqman 探针的设计与合成 根据 GenBank 数据库中派琴虫和折光马尔太虫的保守序列, 采用 Primer Express 2.0 软件, 设计两对特异性引物和两条 Taqman 探针(表 1)。

核酸抽提 取待检贝类的鳃、心脏、消化腺组织等共约 100 mg, 匀浆后根据海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒的说明书进行 DNA 的提取,

收稿日期: 2009-07-28; 修订日期: 2010-03-26

基金项目: 国家百千万人才工程入选专项资金项目(No.945200603); 广西科技攻关项目(桂科攻 0630001-3M)资助

通讯作者: 谢芝勋(1963—), 男, 广西博白人; 研究员; 主要从事动物传染病防治技术的研究。Tel: 0771-3105702; E-mail: xiez-hixun@126.com

表 1 引物和 TaqMan 探针序列
Tab. 1 Sequence of primers and TaqMan probes

引物 Primers	序列 Sequence	大小 Size	扩增的区域 The amplification regions
Perkinsus 133	5'-TCAAAACGAAATTCCAAACTCTCA-3'	69 bp	Internal transcribed spacer
Perkinsus 201	5'-CTTCGCTGCGTCCTTCATC-3'		
Perkinsus 158T	5'-FAM-CGATGGATGCCTCGGCTCGAG-ECLIPSE-3'		
Marteilia 396	5'-AGAAAACGTGTCAGCCGAAGT-3'	64 bp	Intergenic spacer
Marteilia 459	5'-TCGAGCGAGGCGATCAC-3'		
Marteilia 423T	5'-HEX-TGAACAAACCGTGGCGGCG-ECLISPE-3'		

参照 Sambrook 方法测定核酸的浓度和纯度^[13]。对照菌株 DNA 的抽提按同样方法进行。

标准品的制备 以派琴虫和折光马尔太虫的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μ L [含 0.2 mmol/L dNTP、2.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.5 μ mol/L 引物(表 2)、1.25 U Taq 聚合酶、1 $\times$ PCR buffer 和 5 μ L DNA 模板], 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 60s, 50 $^{\circ}$ C 60s, 70 $^{\circ}$ C 60s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段后克隆至 pMD 18-T 载体, 阳性克隆菌(pMD-Perkinsus 和 pMD-Marteilia)送大连宝生生物技术有限公司进行测序。提取 pMD-Perkinsus 和 pMD-Marteilia 质粒作为阳性标准品, 按照文献[12]计算拷贝数。

引物和探针浓度的筛选 应用质粒 pMD-Perkinsus 和 pMD-Marteilia 作为标准品, 将表 1 中的引物和探针在终浓度为 0.2—0.8 μ mol/L 之间, 进行不同浓度的配比进行荧光定量 PCR, 选择引物和探针的最佳浓度。

荧光定量 PCR 的反应条件 扩增反应总体积为 20 μ L, 其中 Real time PCR Premix 10 μ L; 0.6 μ L 的 Perkinsus 133、Perkinsus 201 和 Perkinsus 158T; 0.15 μ L Marteilia 396、Marteilia 459 和 Marteilia 423T; 模板 2 μ L; 余下用灭菌 DEPC 水补足, 均匀混合, 置 Lightcycler 荧光定量 PCR 仪上进

行自动化扩增反应。温度转换率为 20 $^{\circ}$ C/s, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 5s、60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30s 进行 42 个循环; 最后于 40 $^{\circ}$ C 结束反应。

1.4 敏感性试验

用质粒 pMD-Perkinsus 和 pMD-Marteilia 的混合液作为标准品, 10 倍系列稀释后进行荧光定量 PCR。

1.5 二重实时荧光定量 PCR 的特异性试验

加入派琴虫的基因组 DNA 作模板, 同时加入针对派琴虫和折光马尔太虫的引物、探针进行实时荧光 PCR 检测, 对仪器中的每个检测孔同时收集 FAM 和 HEX 两种荧光信号, 确定该方法的引物与探针在派琴虫和折光马尔太虫之间的特异性。用同样的方法进行折光马尔太虫的二重单检特异性试验。利用本研究建立的二重荧光定量检测方法, 对单孢子虫及对照菌株(嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、河弧菌和拟态弧菌)的核酸进行特异性检测。

1.6 重复性试验

用 1×10^6 拷贝/ μ L 的派琴虫和折光马尔太虫混合的阳性样品, 分 3 个标本同时检测。通过计算 Ct 值的标准差(S)和变异系数(CV)来验证荧光定量 PCR 的批内重复性。3d 后重复检测保存于-20 $^{\circ}$ C 的模板 DNA 来验证模板的稳定性及荧光定量 PCR 的批间重复性。

表 2 试验所使用引物序列
Tab. 2 The primers used in the study

引物 Primers	序列 Sequence	大小 Size	扩增区域 The amplification regions
Perkinsus 1	5'-GGGCCGTGTTAGGTGATTAT-3'	596 bp	Internal transcribed spacer
Perkinsus 2	5'-ACCGACAAGCGTGCTATGAT-3'		
Marteilia 1	5'-TACGACCGTAGCCTTTCCAC-3'		
Marteilia 2	5'-CGCCTCTACTCTTCTCCCAA-3'	478 bp	Intergenic spacer

1.7 干扰性试验

将派琴虫和折光马尔太虫标准样品按不同的浓度进行组合(4×10^8 和 4×10^1 ; 4×10^1 和 4×10^8), 分别进行二重荧光定量 PCR 和单重荧光定量 PCR 检测, 确定浓度相差较大时派琴虫和折光马尔太虫之间的检测是否存在相互干扰现象。

1.8 临床样本的检测

利用建立的贝类派琴虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法, 对经常规 PCR 检测阳性的 11 份派琴虫和 2 份折光马尔太虫样本进行检测, 评价其临床实用性。

2 结果

2.1 引物、探针浓度

不同的引物和探针终浓度配比试验结果显示, 不同的引物和探针终浓度对试验结果影响比较大, 派琴虫上、下游引物及探针终浓度为 $0.6 \mu\text{mol/L}$, 折光马尔太虫上、下游引物及探针终浓度为 $0.15 \mu\text{mol/L}$, 对质粒标准品的检测可获得较小的 C_t 值。

2.2 敏感性试验

以 10 倍系列稀释的派琴虫和折光马尔太虫质粒混合液($1 \times 10^6 - 1 \times 10^1$ 拷贝/ μL)为模板进行扩增, 二重荧光定量 PCR 的敏感性结果(图 1、图 2)。从图中的荧光曲线可见, 对派琴虫和折光马尔太虫的检测 40 拷贝仍有荧光曲线, 表明该检测方法对派琴虫和折光马尔太虫的灵敏度为 40 拷贝。

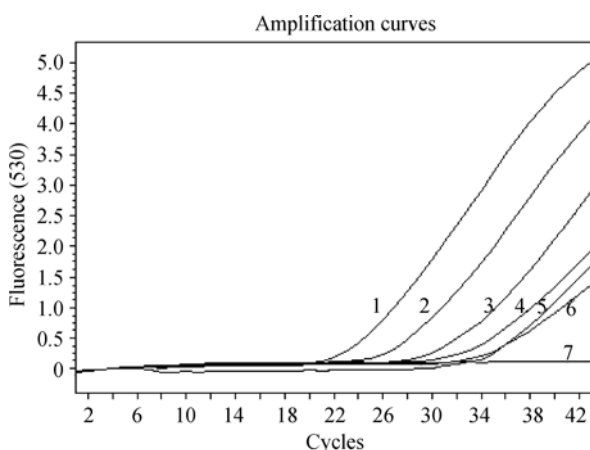


图 1 派琴虫的敏感性试验

Fig. 1 Sensitivity of the duplex real-time PCR for *Perkinsus* sp

1—6. $4 \times 10^6 - 4 \times 10^1$ 拷贝/ μL ; 7. 空白对照

1—6. $4 \times 10^6 - 4 \times 10^1$ copies/ μL ; 7. Negative control

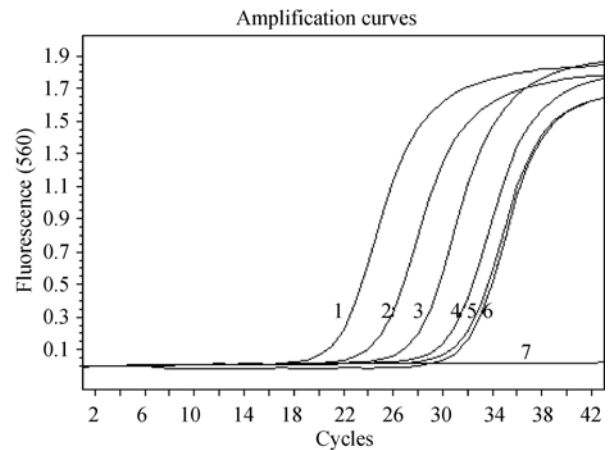


图 2 折光马尔太虫的敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of the duplex real-time PCR for *Marteilia refringens*

1—6. $4 \times 10^6 - 4 \times 10^1$ 拷贝/ μL ; 7. 空白对照

1—6. $4 \times 10^6 - 4 \times 10^1$ copies/ μL ; 7. Negative control

2.3 二重荧光定量 PCR 的特异性

在反应体系中, 只加入派琴虫或折光马尔太虫的 DNA 作为模板, 同时加入针对派琴虫和折光马尔太虫的引物、探针进行荧光定量 PCR 检测, 结果只得到相应原虫的特异性荧光曲线, 证实所设计的引物探针具有特异性。通过对单孢子虫及对照菌株(嗜水气单胞菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、河弧菌和拟态弧菌)的核酸进行特异性检测(图 3、图 4), 结果证实, 该方法特异性强, 与其他检测对象无交叉反应。

2.4 重复性试验

用 4×10^6 拷贝/ μL 的派琴虫和折光马尔太虫混合的阳性样品, 分为 3 个标本同时检测, 检测结果(图 5), 3d 后重复检测保存于 -20°C 的模板 DNA(表 3)。结果说明此方法具有良好的准确性和重复性。

2.5 干扰性试验

将派琴虫和折光马尔太虫的标准品按不同的浓度进行组合, 发现当一个模板浓度较高而另一个模板浓度较低时, 所建立的方法依然可以同时检测到派琴虫和折光马尔太虫, 与派琴虫单重荧光定量 PCR 及折光马尔太虫单重荧光定量 PCR 比较, 检测的 C_t 值变异小于 3%。

2.6 二重荧光定量 PCR 检测临床病料

利用建立的贝类派琴虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法, 对经常规 PCR 检测阳性的 11 份派琴虫和 2 份折光马尔太虫病料进行检测, 结果 11 份派琴虫病料检测的拷贝数为 $3.63 \times 10^6 - 6.53 \times$

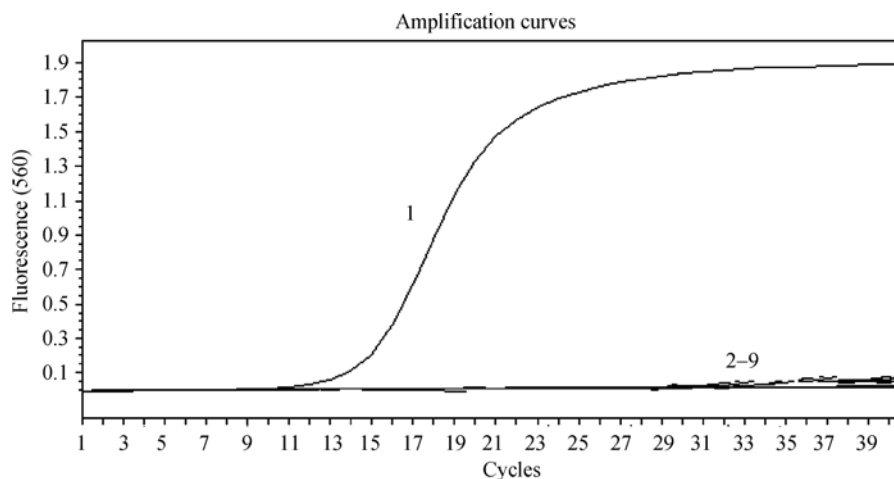


图 3 派琴虫的特异性试验

Fig. 3 The specificity of *Perkinsus* sp

1. 派琴虫; 2. 折光马尔太虫; 3. 单孢子虫; 4. 嗜水气单胞菌; 5. 荧光假单胞菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 溶藻弧菌; 8. 河弧菌; 9. 拟态弧菌
1. *Perkinsus* sp; 2. *Marteilia refringens*; 3. *Haplosporidium* sp; 4. *Aeromonas hydrophila*; 5. *Pseudomonas fluorescens*; 6. *Vibrio parahaemolyticus*; 7. *Vibrio alginolyticus*; 8. *Vibrio fluvialis*; 9. *Vibrio mimicus*

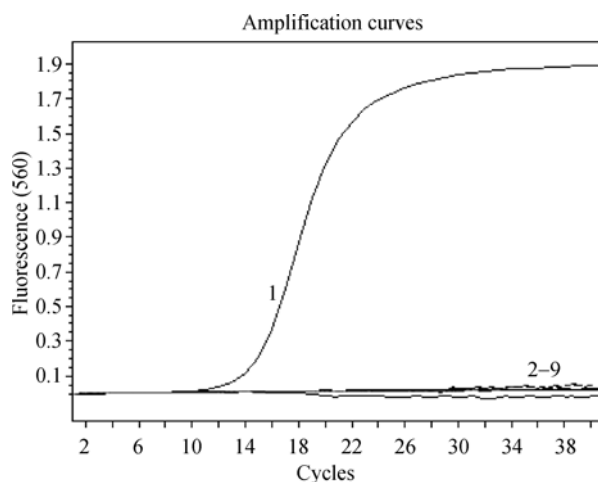


图 4 折光马尔太虫的特异性试验

Fig. 4 The specificity of *Marteilia refringens*

1. 折光马尔太虫; 2. 单孢子虫; 3. 派琴虫; 4. 嗜水气单胞菌; 5. 荧光假单胞菌; 6. 副溶血弧菌; 7. 溶藻弧菌; 8. 河弧菌; 9. 拟态弧菌
1. *Marteilia refringens*; 2. *Haplosporidium* sp; 3. *Perkinsus* sp; 4. *Aeromonas hydrophila*; 5. *Pseudomonas fluorescens*; 6. *Vibrio parahaemolyticus*; 7. *Vibrio alginolyticus*; 8. *Vibrio fluvialis*; 9. *Vibrio mimicus*

10^2 copies/ μ L, 2 份折光马尔太虫病料检测的拷贝数为 $3.48 \times 10^6 - 9.63 \times 10^4$ copies/ μ L。

3 讨论

派琴虫和折光马尔太虫是危害海水养殖贝类的重要病原体, 在欧洲和大洋洲等国家的感染普遍存在^[1-4,14-17]。在过去的二十多年里, 我国从国外引进了多种海洋贝类作为贝种用于海水养殖, 但在进口

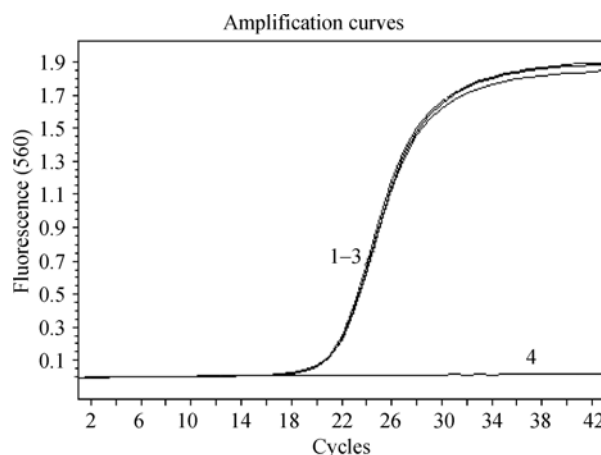


图 5 Duplex real-time PCR 的批内重复性

Fig. 5 The reproducibility of the Duplex real-time PCR

1—3. 4×10^6 拷贝/ μ L; 4. 空白对照

1—3. 4×10^6 copies/ μ L; 4. Negative control

过程中都没有进行派琴虫和折光马尔太虫感染的检测, 派琴虫和折光马尔太虫可能会随着贝类的引进而进入我国, 并在不同贝类间传播。因此迫切需要建立一种快速敏感的派琴虫和折光马尔太虫检测方法。目前国内检测这两种原虫的方法有组织和细胞学检测法、电镜检测法和原位杂交法, 但这些方法操作繁琐费时, 在实际的工作中存在一定的局限性。

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, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术不仅实现了对 DNA 模板的定量,

表 3 Duplex real-time PCR 的批间重复性
Tab.3 The Duplex real-time PCR results of three repetitious detections

样品 Sample	同一模板不同检测时间的 C_t The C_t value/ copy number of the same sample in different times				
	第 1 天 First Day	第 4 天 Fourth Day	第 7 天 Seventh Day	SD	CV
派琴虫 <i>Perkinsus</i> sp	22.05/4×10 ⁶	22.96/4×10 ⁶	23.10/4×10 ⁶	0.570	2.51%
折光马尔太虫 <i>Marteilia refringens</i>	19.58/4×10 ⁶	20.44/4×10 ⁶	20.24/4×10 ⁶	0.450	2.23%

Note: SD=Standard deviation; C_t = Cycle threshold; CV= Coefficient of variation

而且具有灵敏度高、特异性强、准确可靠、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时性好等特点^[18]。在实验室检测中,当样品量非常大时,单重荧光 PCR 在成本和时间方面就存在一定的劣势,迫切需要一种高通量、低成本、高效率的方法来进行批量的快速检测。采用多对引物扩增检测多个模板的多重荧光 PCR,克服了单重荧光 PCR 的不足。但是建立一个多重荧光 PCR 方法比单重的要复杂得多,其对引物和试剂的要求更高,同时需要保证不同探针所标记的荧光基团间无相互干扰,使用的荧光 PCR 仪有相应的多个检测通道^[19,20]。

本研究通过不同浓度的配比,筛选出了派琴虫和折光马尔太虫的最佳引物和探针的浓度组合,建立了二重荧光定量 PCR 方法,实现了一管二检的目的,并且 PCR 反应只需要约 45min 的时间,大大提高了检测速度。另外,根据特异性荧光曲线的域值,可以估算样品中相应病原的含量。低浓度检测时,所建立的二重荧光定量 PCR 的荧光曲线梯度间隔并不明显,本试验对试剂及引物浓度进行优化也未能消除这个现象,推测其可能原因是由于两个模板对试剂的竞争而相互影响造成,或者是由于随着模板的稀释,模板里可能带有的 *Taq* 酶抑制剂也随着稀释的原因造成的。

派琴虫和折光马尔太虫在临床上可能会出现混合感染,两种原虫的含量可能会相差较大。因此,本研究将派琴虫和折光马尔太虫的模板浓度进行调整、组合,从而探讨高浓度模板对低浓度模板是否存在干扰现象。结果发现,当一个模板浓度较高而另一个模板浓度较低时,所建立的方法依然可以同时检测到派琴虫和折光马尔太虫,与派琴虫单重荧光定量 PCR 及折光马尔太虫单重荧光定量 PCR 比较,检测的 C_t 值变异小于 3%。

本研究建立的派琴虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法全程(包括核酸提取、荧光 PCR 扩增)仅需约 3h,鉴别检测的敏感性可达 40 拷贝,对于在贝类派琴虫和折光马尔太虫的发病早期提供准确的诊断结果,切断其传播途径有重要意义。同时建立的荧光定量 PCR 方法还可用于派琴虫和折光马尔太虫疫苗和药物疗效的评估,以及派琴虫和折光马尔太虫致病机理等方面的研究,因此该方法的建立对派琴虫和折光马尔太虫的防治有重要意义。

参考文献:

- [1] Liang Y B, Zhang X C, Wang L J, et al. Prevalence of *Perkinsus* sp in the manila clam *Ruditapes philippinarum* along northern coast of Yellow Sea in China [J]. *Oceanologia Etlimnologia Sinica*, 2001, 32(5): 567—575 [梁玉波, 张喜昌, 王立俊, 等. 北黄海菲律宾蛤仔帕金虫流行病害的研究. 海洋与湖沼, 2001, 32(5): 567—575]
- [2] Hamaguchi M, Suzuki N, Usuki H, et al. *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes* (=Ruditapes) *philippinarum* in Japan [J]. *Fish Pathology*, 1998, 33: 473—480
- [3] Choik S, Park K I. Report on the occurrence of *Perkinsus* sp in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea [J]. *Journal of Aquaculture*, 1997, 10: 227—237
- [4] Powell E N, Klinck J M, Hofmann E E. Modeling diseased oyster populations. II. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics [J]. *Journal of Shellfish Research*, 1996, 15: 141—165
- [5] Audemard C, Barnaud A, Collins C M, et al. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2001, 257(1): 87—108
- [6] Itoh N, Momoyama K, Ogawa K. First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides* sp.) from the Manila clam, *Venerupis* (=Ruditapes) *philippinarum* in Japan [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2005, 88(3): 201—206

- [7] Lopez-Flores I, Robles F, Valencia J M, *et al.* Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and in situ hybridisation in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain) [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, **82**(1): 79—87
- [8] Carrasco N, Arzul I, Berthe F C, *et al.* In situ hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (Paramyxea) in its host *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, **31**(2): 153—157
- [9] Kleeman S N, Le Roux F, Berthe F, *et al.* Specificity of PCR and in situ hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens* [J]. *Parasitology*, 2002, **125**(2): 131—141
- [10] Almeida M, Berthe F, Thebault A, *et al.* Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus* [J]. *Aquaculture*, 1999, **177**, 325—332
- [11] Xie Z X, Xie L J, Liu J B, *et al.* Development of a Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Detection of WSSV and IHNV [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(1): 22—27 [谢芝勋, 谢丽基, 刘加波, 等. WSSV 和 IHNV 二重实时荧光 PCR 检测方法的建立. 水生生物学报, 2009, **33**(1): 22—27]
- [12] Xie Z X, Xie L J, Liu J B, *et al.* Development of a Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Detection of Avian Influenza Virus and Newcastle Disease Virus [J]. *Letters in Biotechnology*, 2008, **19**(3): 410—413 [谢芝勋, 谢丽基, 刘加波, 等. 禽流感和新城疫病毒二重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立. 生物技术通讯, 2008, **19**(3): 410—413]
- [13] Sambrook J, Fritsh E T, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 6—7 [B.23; E.8—9] .
- [14] Audemard C, Sajus M C, Barnaud A, *et al.* Infection dynamics of *Marteilia refringens* in flat oyster *Ostrea edulis* and copepod *Paracartia grani* in a claire pond of Marennes-Olon Bay [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, **61**(1-2): 103—111
- [15] Lopez-Flores I, Garrido-Ramos M A, Herran R de la, *et al.* Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and in situ hybridization [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2008, **22**(3): 151—155
- [16] Carrasco N, Lopez-Flores I, Alcaraz M, *et al.* Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (Paramyxea) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain) [J]. *Parasitology*, 2007, **134**(11): 1541—1550
- [17] Spencer Russell, Salvatore Frasca Jr., Inke Sunila, *et al.* Application of a multiplex PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, **59**: 85—91
- [18] Zhang H, Li B, Zhou X, *et al.* Progress and application of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, **27**(Suppl.): 5—12 [张贺, 李波, 周虚, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用. 动物医学进展, 2006, **27**(增): 5—12]
- [19] Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, *et al.* Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(20): e122—e122
- [20] Xie Z X, Xie L J, Pang Y S, *et al.* Development of a real-time multiplex PCR assay for detection of viral pathogens of penaeid shrimp [J]. *Archives of Virology*, 2008, **153**: 2245—2251

DEVELOPMENT OF A DUPLEX REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION OF *PERKINSUS* AND *MARTEILIA REFRINGENS* IN SHELLFISH

XIE Zhi-Xun , XIE Li-Ji, PANG Yao-Shan, LIU Jia-Bo, DENG Xian-Wen and XIE Zhi-Qin

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001)

Abstract: *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens* are responsible for significant economic loss in the shellfish industry. In order to identify *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens* simultaneously and massively, two pair of primers and two TaqMan probes were designed and synthesized according to the conserved gene sequences of *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens* in GenBank. The reaction parameters such as the concentration of two pair of primers, two TaqMan probes and the reaction buffer were optimized to develop a duplex real-time PCR assay for the rapid detection of *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens*. The duplex real-time PCR assay was found to be specific and able to detect and differentiate *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens*, and no positive results were observed when nucleic acid from *Haplosporidium* sp, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio Alginolyticus*, *Vibrio Fluvialis* and *Vibrio Mimicus* were used as duplex real-time PCR templates. The sensitivity of the developed duplex real-time PCR assay was 40 template copies for *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens*. The samples were examined using the duplex real-time PCR repeatedly and the results indicated that the duplex real-time PCR was reproducible. When different concentrations of *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens* mixed together still could be identified by this assay, which implied the assay could be applied to clinical confirmation for simultaneous infection of *Perkinsus* sp and *Marteilia refringens*. The duplex real-time PCR results of the samples showed that one specific amplified curve was displayed when shellfish was infected by only one of these two protozoan pathogens, whereas two specific amplified curves were displayed when shellfish was infected by two protozoan pathogens. The result indicated that duplex real-time PCR was able to detect and differentiate the presence of each protozoan pathogen in infected clinical shellfish. This duplex real-time PCR assay was a quick, sensitive, specific and quantitative tool for detection of protozoan, and will be useful for the control of protozoan parasites in shellfish.

Key words: *Perkinsus* sp; *Marteilia refringens*; Duplex real-time PCR