

贝类单孢子虫和折光马尔太虫二重 荧光定量 PCR 方法的建立

谢丽基 谢芝勋* 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 GenBank 中单孢子虫和折光马尔太虫基因序列, 用 Primer Express 2.0 软件设计了两对引物和两条 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单孢子虫和折光马尔太虫的二重荧光定量 PCR 方法。该方法对单孢子虫和折光马尔太虫的检测敏感性达到 40 个模板拷贝数; 此外抗干扰能力强, 对单孢子虫和折光马尔太虫不同模板浓度进行组合, 仍可有效地同时检测到这两个原虫。该方法对派琴虫、荧光假单胞菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌、河弧菌和拟态弧菌等病原体的检测, 结果全为阴性。研究建立的单孢子虫和折光马尔太虫荧光定量 PCR 具有特异、敏感、快速、定量、重复性好等优点, 可用于贝类单孢子虫和折光马尔太虫感染的检测。

关键词 单孢子虫 折光马尔太虫 二重荧光定量 PCR

中图分类号 S944.3, Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2010)03-0077-07

Development of duplex real-time PCR assay for detection of *Haplosporidium* sp. and *Marteilia refringens* in shellfish

XIE Li-ji XIE Zhi-xun* PANG Yao-shan LIU Jia-bo

DENG Xian-wen XIE Zhi-qin

(Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001)

ABSTRACT Two sets of specific oligonucleotide primers for *Haplosporidium* sp. and *Marteilia refringens*, along with two TaqMan probes specific for each protozoan parasite were designed with Primer Express 2.0 software. The reaction parameters such as the concentration of two pair of primers, two TaqMan probes and the reaction buffer were optimized to develop duplex real-time PCR assay for the rapid detection of *Haplosporidium* sp. and *Marteilia refringens*. The sensitivity of duplex real-time PCR assay was 40 template copies for *Haplosporidium* sp. and *Marteilia refringens*. The duplex real-time PCR assay was found to be specific and to be able to detect and differentiate *Haplosporidium* sp. and *Marteilia refringens*, and no positive results were observed when nucleic acid from *Perkinsus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. Alginolyticus*, *V. Fluvialis* and *V. Mimicus* were used as duplex real-time PCR templates. This duplex real-time PCR assay is a rapid, sensitive, and specific test for

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

* 通讯作者。E-mail: xiezhi-xun@126.com, Tel: (0771) 3105702

收稿日期: 2009-07-09; 接受日期: 2009-09-09

作者简介: 谢丽基(1981-), 女, 硕士, 主要从事动物传染病原分子生物学研究。E-mail: xieliji2009@yahoo.cn, Tel: (0771) 3120371

detection of *Haplosporidium* sp and *Marteilia refringens* and will be useful for the control of these protozoan parasites in shellfish.

KEY WORDS *Haplosporidium* sp. *Marteilia refringens* Duplex real-time PCR

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单孢子虫 *Haplosporidium* sp. 和折光马尔太虫 *Marteilia refringens*。单孢子虫主要感染血细胞、结缔组织和消化道上皮,可引起较高的死亡率(Hine *et al.* 2002; Ulrich *et al.* 2007)。马尔太虫可引起贝类消瘦、消化道变色、停止生长并死亡(Audemard *et al.* 2001; Itoh *et al.* 2005)。

单孢子虫和折光马尔太虫的传统检测方法有电镜观察、组织细胞学检查和原位杂交等检测方法,这些方法费时费力,在实际工作中具有一定的局限性(Perkins 1969; Stokes *et al.* 1995; Carrasco *et al.* 2008; Kleeeman *et al.* 2002; Spencer *et al.* 2004)。病原检测、筛选建立无特定病原体的健康群是目前预防与控制这些原虫病的有效办法。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、敏感性高、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。目前,还未见有应用多重荧光定量 PCR 技术对贝类单孢子虫和折光马尔太虫进行检测和诊断的报道,本研究设计多对引物,建立了单孢子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

Lightcycler 2.0 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 试剂盒购自大连宝生物公司;DNA 片断回收试剂盒购自 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

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

1.3 荧光定量 PCR 方法的建立

1.3.1 引物与 TaqMan 探针的设计与合成

根据 GenBank 中单孢子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)。

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

引物 Primer	序列 Sequence	大小 Size(bp)	扩增的区域 Amplification region
Haplosporidium-1241	5-TGCATGGCCGTTCTTAGTTG-3	68	
Haplosporidium-1308	5-GGCTGAGGTCCCGTTTCGT-3		16S-like ribosomal RNA
Haplosporidium-1262T	5-ROX-TGGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGTT-ECLIPSE-3		
Marteilia 396	5-AGAAAACCTGTGCAGCCGAAGT-3	64	
Marteilia 459	5-TCGAGCGAGGCGATCAC-3		Intergenic spacer
Marteilia 423T	5-HEX-TGAACAAACCGTGGCGGCG-ECLISPE-3		

1.3.2 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,参照 Sambrook 等(1989)方法测定核酸的浓度和纯度。对照病原 DNA 的抽提按同样方法进行。

1.3.3 标准品的制备

以单孢子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、5 μ l DNA 模板),反应条件为:95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}C$ 60 s,50 $^{\circ}C$ 60 s,72 $^{\circ}C$ 60s,35 个循环,72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,回收目的片断后克隆至 pMD-18T 载体,阳性克隆菌(pMD-*Haplosporidium* 和 pMD-*Marteilia*)送大连宝生物技术有限公司进行测序。提取 pMD-*Haplosporidium* 和 pMD-*Marteilia* 质粒作为阳性标准品,按照文献(谢芝勋等 2008)计算拷贝数。

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

引物 Primer	序列 Sequence	大小 Size(bp)	扩增区域 Amplification region
Haplosporidium 1241	5-TGCATGGCCGTTCTTAGTTG-3	303	16S-like ribosomal RNA
Haplosporidium 8	5-ATGAACAATTGCAATCATCT-3		
Marteilia 1	5-TACGACCGTAGCCTTCCAC-3	478	Intergenic spacer
Marteilia 2	5-CGCCTCTACTTCTCCCAA-3		

1.3.4 引物和探针浓度的筛选

应用质粒 pMD-*Haplosporidium* 和 pMD-*Marteilia* 作为标准品,将表 1 中的引物和探针在终浓度为 0.1~0.8 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。

1.3.5 荧光定量 PCR 的反应条件

优化后的反应体系如下:总体积为 20 μ l,其中 Real time PCR Premix 10 μ l;0.4 μ mol/L Haplosporidium-1241、Haplosporidium-1308 和 Haplosporidium-1262T;0.2 μ mol/L Marteilia 396、Marteilia 459 和 Marteilia 423T;模板 2 μ l;余下用灭菌 DEPC 水补足,反应程序为:94 $^{\circ}C$ 预变性 30 s;然后按 94 $^{\circ}C$ 变性 10 s、60 $^{\circ}C$ 退火延伸 30 s 进行 50 个循环;最后于 40 $^{\circ}C$ 结束反应。

1.4 敏感性试验与标准曲线的建立

用含有目的片段的质粒 pMD-*Haplosporidium* 和 pMD-*Marteilia* 作标准品,10 倍系列稀释后进行荧光定量 PCR,重复试验两次。

1.5 二重荧光定量 PCR 的特异性试验

加入单孢子虫的基因组 DNA 作模板,同时加入针对单孢子虫和折光马尔太虫的引物、探针进行荧光定量 PCR 检测,对仪器中的每个检测孔同时收集 HEX 和 ROX 两种荧光信号,确定该方法的引物与探针在单孢子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,对对照病原(派琴虫、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 的单孢子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。3 d后重复检测保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的模板 DNA, 来验证荧光定量 PCR 的批间重复性。

1.7 干扰性试验

将单孢子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单孢子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 二重荧光定量 PCR 检测临床病料

利用建立的贝类单孢子虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法, 对经常规 PCR 检测阳性的两份单孢子虫和两份折光马尔太虫病料进行检测, 评价其临床实用性。

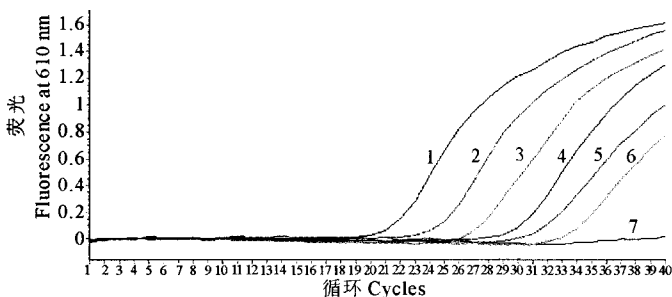
2 结果

2.1 引物、探针浓度

单孢子虫上、下游引物及探针终浓度分别为 $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$, 折光马尔太虫上、下游引物及探针终浓度分别为 $0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$, 对两种原虫的检测可获得典型的 S 状, 并且 Ct 值较小。

2.2 敏感性试验与标准曲线的建立

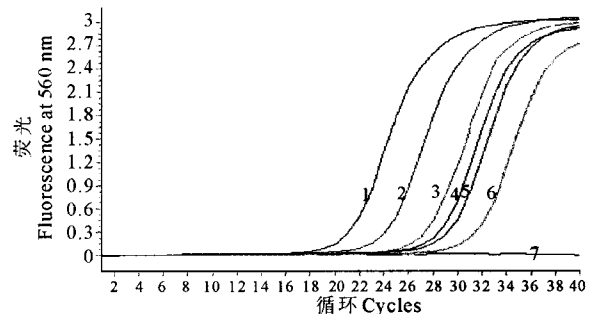
以 10 倍系列稀释的单孢子虫和折光马尔太虫质粒混合液($1\times 10^6\sim 1\times 10^1$ 拷贝/ μl)为模板进行扩增, 扩增效率分别为 97.25% 和 98.32%, 二重荧光定量 PCR 的敏感性结果分别见图 1 和图 2。从图 1 和图 2 中的荧光曲线可见, 对单孢子虫和折光马尔太虫的检测 40 拷贝仍有荧光曲线, 表明该检测方法对单孢子虫和折光马尔太虫的灵敏度为 40 拷贝, 重复结果一致。



注: 1~6. $4\times 10^6\sim 4\times 10^1$ 拷贝/ μl ; 7. 空白对照
Note: 1~6. $4\times 10^6\sim 4\times 10^1$ copies/ μl ; 7. Negative control

图 1 荧光定量 PCR 检测单孢子虫的敏感性试验

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



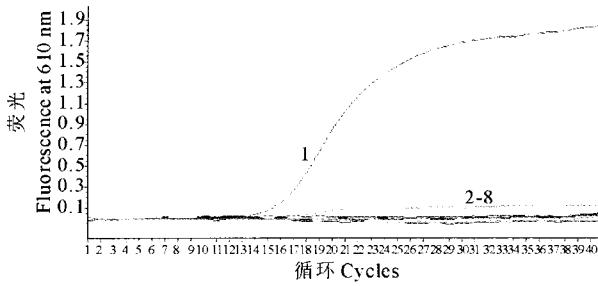
注: 1~6. $4\times 10^6\sim 4\times 10^1$ 拷贝/ μl ; 7. 空白对照
Note: 1~6. $4\times 10^6\sim 4\times 10^1$ copies/ μl ; 7. Negative control

图 2 荧光定量 PCR 检测折光马尔太虫的敏感性试验

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

2.3 二重荧光定量 PCR 的特异性

在反应体系中, 只加入单孢子虫或折光马尔太虫的 DNA 作为模板, 同时加入针对单孢子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。通过对对照病原(派琴虫、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 和图 4), 结果证实, 该方法特异性强, 与其他检测对象无交叉反应。

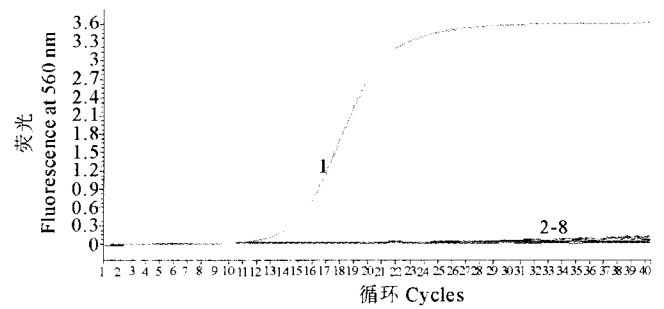


注: 1. 单孢子虫; 2. 折光马尔太虫; 3. 派琴虫; 4. 荧光假单胞菌; 5. 副溶血弧菌; 6. 溶藻弧菌; 7. 河弧菌; 8. 拟态弧菌

Note: 1. *Haplosporidium* sp.; 2. *Marteilia refringens*; 3. *Perkinsus* sp.; 4. *P. fluorescens*; 5. *V. parahaemolyticus*; 6. *V. Alginolyticus*; 7. *V. fluvialis*; 8. *V. mimicus*

图 3 荧光定量 PCR 检测单孢子虫的特异性试验

Fig. 3 Specificity of the duplex real-time PCR for *Haplosporidium* sp.



注: 1. 折光马尔太虫; 2. 单孢子虫; 3. 派琴虫; 4. 荧光假单胞菌; 5. 副溶血弧菌; 6. 溶藻弧菌; 7. 河弧菌; 8. 拟态弧菌

Note: 1. *Marteilia refringens*; 2. *Haplosporidium* sp.; 3. *Perkinsus* sp.; 4. *P. fluorescens*; 5. *V. parahaemolyticus*; 6. *V. Alginolyticus*; 7. *V. fluvialis*; 8. *V. mimicus*

图 4 荧光定量 PCR 检测折光马尔太虫的特异性试验

Fig. 4 Specificity of the duplex real-time PCR for *Marteilia refringens*

2.4 重复性试验

用 4×10^6 拷贝/ μl 的单孢子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, 检测结果见图 5, 3 d 后重复检测保存于 -20°C 的模板 DNA, 其结果见表 3。结果说明此方法具有良好的准确性和重复性。

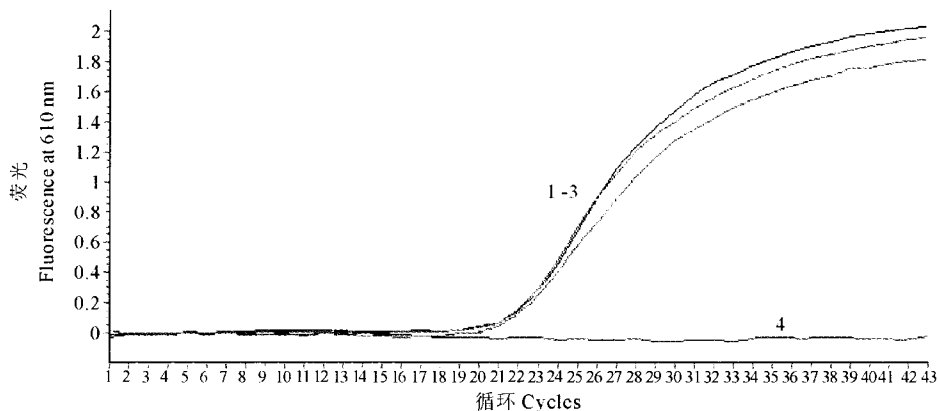
表 3 Duplex real-time PCR 的批间重复性

Table 3 The duplex real-time PCR results of three repetitious tests

同一模板不同检测时间的 Ct						The Ct value/copy number of the same sample at different time					
样品 Sample	第 1 天 1st Day	第 4 天 4th Day	第 7 天 7th Day	SD	CV(%)	样品 Sample	第 1 天 1st Day	第 4 天 4th Day	第 7 天 7th Day	SD	CV(%)
单孢子虫 <i>Haplosporidium</i> sp.	20.15 4×10^6	20.81 4×10^6	20.10 4×10^6	0.396	1.95	折光马尔太虫 <i>Marteilia refringens</i>	19.85 4×10^7	20.33 4×10^7	20.13 4×10^7	0.241	1.20

注: SD: 标准偏差; Ct: 循环阈值; CV: 变异系数

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



注: 1-3. 4×10^6 拷贝/ μl ; 4. 空白对照 Note: 1-3. 4×10^6 copies/ μl ; 4. Negative control

图 5 Duplex real-time PCR 的批内重复性

Fig. 5 Reproducibility of the duplex real-time PCR in one batch

2.5 干扰性试验

将单孢子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单孢子虫和折光马尔太虫,与单孢子虫单重荧光定量 PCR 及折光马尔太虫单重荧光定量 PCR 比较,检测的 Ct 值变异小于 3%。

2.6 临床病料检测结果

利用建立的贝类单孢子虫和折光马尔太虫二重荧光定量 PCR 方法,对经常规 PCR 检测阳性的两份单孢子虫和两份折光马尔太虫病料进行检测,结果两份单孢子虫病料检测的拷贝数为 $1.10 \times 10^6 \sim 2.69 \times 10^5$ copies/ μl ,两份折光马尔太虫病料检测的拷贝数为 $3.65 \times 10^6 \sim 9.88 \times 10^4$ copies/ μl 。

3 讨论

单孢子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、美洲和大洋洲等国家的感染普遍存在(Kleeman *et al.* 2002; Audemard *et al.* 2004; Lopez-Flores *et al.* 2008; Carrasco *et al.* 2007; Spencer *et al.* 2004; Haskin *et al.* 1966; Barber *et al.* 1997; Sunila *et al.* 1999),在过去的 20 余年里,我国从国外引进了多种海洋贝类作为贝种用于海水养殖,但在进口过程中都没有进行单孢子虫和折光马尔太虫感染的检测(王中卫等 2009),单孢子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单孢子虫和折光马尔太虫检测方法。目前国外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 技术不仅实现了对 DNA 模板的定量,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。在实验室检测中,当样品量非常大时,单重荧光定量 PCR 在成本和时间方面存在一定的劣势。多重荧光定量 PCR 克服了单重荧光定量 PCR 的不足,但是建立一个多重荧光定量 PCR 方法比单重的要复杂得多,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等(Tichopad *et al.* 2003; Xie *et al.* 2008)。

本研究通过不同浓度的配比,筛选出了单孢子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,并且 PCR 反应只需要约 30 min 的时间,大大提高了检测速度,同时该方法可以根据标准品,估算出样品中相应病原的含量。单孢子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。本研究发现,当一个原虫 DNA 含量较高而另一个原虫 DNA 含量较低时,所建立的方法依然可以同时检测到两个原虫,说明所建立的方法适用于这两个原虫的临床检测。

本研究建立的单孢子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、荧光定量 PCR 扩增)仅需约 3 h,鉴别检测的敏感性可达 40 拷贝,对于在贝类单孢子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 方法还可用于单孢子虫和折光马尔太虫疫苗和药物疗效的评估,以及单孢子虫和折光马尔太虫致病机理等方面的研究,因此,该方法的建立对单孢子虫和折光马尔太虫的防治有重要意义。

参 考 文 献

- 王中卫,吕昕,梁斌,梁玉波. 2009. 长牡蛎尼氏单孢子虫的初步研究. 海洋环境科学, 28(2): 164~166
- 谢芝勋,谢丽基,刘加波,庞耀珊,邓显文. 2008. 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, 19(3): 410~413
- Audemard, C., Barnaud, A., Collins, C. M., Le Rouxa, F., Sauriaub, P. G., Coustauc, C., Blachierd, P., and Berthe, F. C. J. 2001. Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies; new perspectives. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 257(1): 87~108
- Audemard, C., Sajus, M. C., Barnaud, A., Sautour, B., Sauriau, P. G., and Berthe, F. J. 2004. Infection dynamics of *Marteilia refringens* in

- flat oyster *Ostrea edulis* and copepod *Paracartia grani* in a claire pond of Marennes-Olon Bay. *Dis. Aquat. Organ.* 61(1-2): 103~11
- Barber, B. J., Langan, R., and Howell, T. L. 1997. *Haplosporidium nelsoni* (MSX) epizootic in the Piscataqua River Estuary (Maine/New Hampshire, USA). *J. Parasitol.* 83: 148~150
- Carrasco, N., Arzul, I., Berthe, F. C. J., and Furones, M. D. 2008. *In situ* hybridization detection of initial infective stages of *Marteilia refringens* (*Paramyxea*) in its host *Mytilus galloprovincialis*. *J. Fish. Dis.* 31(2): 153~157
- Carrasco, N., Lopez-Flores, I., Alcaraz, M., Furones, M. D., Berthe, F. C., and Arzul, J. I. 2007. Dynamics of the parasite *Marteilia refringens* (*Paramyxea*) in *Mytilus galloprovincialis* and zooplankton populations in Alfacs Bay (Catalonia, Spain). *Parasitol.* 134(Pt 11): 1 541~1 550
- Haskin, H. H., Stauber, L. A., and Mackin, J. A. 1966. *Minchinia nelsoni*, sp. (*Haplosporidia*, *Haplosporidiidae*); causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. *Science*, 153; 1 414~1 416
- Hine, P. M., and Thorne, T. 2002. *Haplosporidium* sp. (*Alveolata*: *Haplosporidia*) associated with mortalities among rock oysters *Saccostrea cucullata* in north Western Australia. *Dis. Aquat. Organ.* 51(2): 123~133
- Itoh, N., Momoyama, K., and Ogawa, K. 2005. First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides* sp.) from the Manila clam, *Venerupis* (= *Ruditapes*) philippinarum in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 88(3): 201~206
- Kleeman, S. N., Le Roux, F., Berthe, F. *et al.* 2002. Specificity of PCR and *in situ* hybridization assays designed for detection of *Marteilia sydneyi* and *M. refringens*. *Parasitol.* 125(Pt 2): 131~141
- Lopez-Flores, I., Garrido-Ramos, M. A., de la Herran, R., Ruiz-Rejón, C., Ruiz-Rejón, M., and Navas, J. I. 2008. Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and *in situ* hybridization. *Mol. Cell Probes*, 22(3): 151~155
- Lopez-Flores, I., Robles, F., Valencia, J. M., Grau, A., Villalba, A., de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M. A., Ruiz-Rejón, C., Ruiz-Rejón, M., and Navas, J. I. 2008. Detection of *Marteilia refringens* using nested PCR and *in situ* hybridization in *Chamelea gallina* from the Balearic Islands (Spain). *Dis. Aquat. Organ.* 82(1): 79~87
- Perkins, F. O. 1969. Electron microscope studies of sporulation in the oyster pathogen *Minchinia costalis* (*Sporozoa*: *Haplosporida*). *J. Parasitol.* 55: 897~920
- Russell, S., Frasca, S. Jr., Sunila, I., and French, R. A. 2004. Application of a multiplex PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples. *Dis. Aquat. Org.* 59: 85~91
- Sambrook, J., Fritsh, E. T., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Stokes, N. A., and Burrenson, E. M. 1995. A sensitive and specific DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *J. Euk. Microbiol.* 42: 350~357
- Sunila, I., Karolus, J., and Volk, J. 1999. A new epizootic of *Haplosporidia* (MSX), a *Haplosporidian* oyster parasite, in Long Island Sound. *J. Shellfish Res.* 18: 169~174
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., and Pfaffl, M. W. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 31(20): e122
- Ulrich, P. N., Ewart, J. W., and Marsh, A. G. 2007. Prevalence of *Perkinsus marinus* (dermo), *Haplosporidium nelsoni* (MSX), and QPX in bivalves of Delaware's inland bays and quantitative, high-throughput diagnosis of dermo by QPCR. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54(6): 520~526
- Xie, Z. X., Xie, L. J., Pang, Y. S. *et al.* 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for detection of viral pathogens of penaeid shrimp. *Arch. Virol.* 153: 2 245~2 251