



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107604051 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201710815782.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.09.12

C12Q 1/6851(2018.01)

(66)本国优先权数据

G01N 33/53(2006.01)

201710652425.4 2017.08.02 CN

(71)申请人 上海城市水资源开发利用国家工程
中心有限公司

地址 200082 上海市杨浦区许昌路230号1
幢

申请人 上海交通大学

(72)发明人 陈蕾 何义亮 姜蕾 杨坤 刘爽
严棋

(74)专利代理机构 上海国智知识产权代理事务
所(普通合伙) 31274

代理人 潘建玲

权利要求书2页 说明书6页
序列表1页

(54)发明名称

一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法

(57)摘要

本发明通过了一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,该方法通过往培养液中加入不同浓度的氯离子和硫酸根,检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数,建立不同浓度的氯离子或硫酸根、微囊藻毒素含量以及藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数之间的相关性,最终通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究藻毒素的含量。该方法特异性强、灵敏度较高,所需时间比较短、操作比较简单,所需仪器设备和试剂相对简单。

1. 一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,该方法通过往培养液中加入不同浓度的氯离子和硫酸根,检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数,建立不同浓度的氯离子或硫酸根、微囊藻毒素含量以及藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数之间的相关性,最终通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究藻毒素的含量,包括以下步骤:

(1),用不同浓度的氯离子和硫酸根培养铜绿微囊藻培养液,从所述铜绿微囊藻培养液中收集藻细胞;

(2),提取上述步骤(1)中收集的藻细胞内的总RNA,并对提取的总RNA进行反转录,合成cDNA;

(3),以上述步骤(2)合成的cDNA为模板进行PCR扩增,引物信息如下:

上游引物:5' - GCCCAGAAAACCCCAACTC -3' ;

下游引物:5' - TTTCTGCCTAATCTTTTCCCCTCT -3' ;

(4),对目标基因进行纯化;

(5),进行质粒转化,制备质粒标准品;

(6),建立上述步骤(5)制备的标准品的浓度与临界循环数对应的一元线性回归曲线,将所述一元线性回归曲线作为标准曲线;

(7),对待测样品进行定量PCR测定,根据上述步骤(6)得到的标准曲线确定待测样品的DNA浓度;

(8),应用酶联免疫吸附法对待测样品中的微囊藻毒素进行检测;

(9),对上述步骤(7)和步骤(8)的结果进行相关性分析,通过测定mcyD基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。

2. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(1)的具体步骤为:取不同浓度的氯离子和硫酸根培养铜绿微囊藻培养液,用离心机离心后,去掉上清液,用磷酸缓冲盐溶液将藻细胞转移至离心管中,在4℃的温度下离心10分钟,去掉上清液,收集藻细胞,将收集到的藻细胞放于-80℃的冰箱中,用于后续操作。

3. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(2)的具体步骤为:利用RNA提取试剂盒提取步骤(1)中收集的藻细胞内的总RNA,应用专用于实时定量PCR的反转录试剂盒进行RNA的反转录,合成cDNA。

4. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(3)的具体步骤为:以步骤(2)中合成的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50μL,引物信息如下:

上游引物:5' - GCCCAGAAAACCCCAACTC -3' ;

下游引物:5' - TTTCTGCCTAATCTTTTCCCCTCT -3' ;

反应程序为:95℃预变性5 min,随后94℃30 s,退火温度60℃40 s和72℃延伸40 s,进行30个循环,最终72℃延伸10 min,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

5. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(4)的具体步骤为:利用Axygen的DNA柱式胶回收

试剂盒进行胶回收,对目标基因进行纯化,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

6. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(5)的具体步骤为:将步骤(4)中纯化的DNA插入质粒载体pMD18-T中,并进一步转化到DH5 α 感受态大肠杆菌溶液中,然后涂布到加入Amp抗性的LB固体培养基上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落,测定质粒浓度后,梯度稀释,将稀释后的质粒作为标准样品。

7. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(6)的具体步骤为:建立标准品的浓度与临界循环数对应的一元线性回归曲线,将得到的一元线性回归曲线作为标准曲线。

8. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(7)的具体步骤为:对待测样品进行定量PCR的测定,根据步骤(6)得到的标准曲线确定待测样品中的DNA浓度。

9. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(8)的具体步骤为:应用酶联免疫吸附法测定微囊藻毒素含量,取50毫升藻细胞培养液,4℃条件下10000转离心10 分钟,收集上清液,用于测定培养液中微囊藻毒素含量;用PBS缓冲液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,4℃条件下10000转离心10 分钟,洗涤一次,用1毫升PBS缓冲液悬浮沉淀的藻细胞,液氮反复冻融三次,4℃条件下10000转离心10 分钟,收集上清液,用于测定铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素含量;每个样品设置三个平行样,用ELISA试剂盒测定微囊藻毒素含量,在测定样品中微囊藻毒素含量前,需要进行预实验,以确定样品稀释倍数,使得微囊藻毒素测定值在试剂盒检测范围内,最后计算时乘以稀释倍数,即可算出样品中实际微囊藻毒素含量。

10. 根据权利要求1所述的一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,所述步骤(9)的具体步骤为:对步骤(7)和步骤(8)的结果进行相关性分析,建立不同浓度氯离子和硫酸根培养的铜绿微囊藻中藻毒素产生量与mcyD基因拷贝数的关系,利用上述步骤中藻毒素产生量与mcyD基因拷贝数的关系,通过测定mcyD基因拷贝数来确定不同培养条件下藻毒素的生成量。

一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,尤其涉及一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法。

背景技术

[0002] 咸潮入侵在世界范围内均有发生,多发生在沿海地区,尤其是河口区域。气候变化和人为活动可增加咸潮入侵发生的频率和危害。咸潮入侵给工业、农业和饮用水的使用带来了一系列的危害。咸潮入侵带来大量的咸水和离子,改变淡水水体的光气候和混合特性,影响水体中能量和营养物循环。大量的盐使得水体中悬浮物聚集和絮凝,导致水体中的颗粒物被移除,增加了水体透光率,促进了水体生物的光合作用,有助于蓝藻水华的形成。

[0003] 铜绿微囊藻是水体中最为常见的蓝藻,它是水体中的初级生产者,在水环境中发挥着重要的作用。铜绿微囊藻可以产生微囊藻毒素,它是一种环状的寡肽肝毒素,在全世界很多国家的天然水体中都能检测到微囊藻毒素。微囊藻毒素影响浮游植物、无脊椎动物和脊椎动物的生长。微囊藻毒素可以导致水体细菌、原生动物和其他浮游植物(包括硅藻和绿藻)中毒,抑制它们的生长繁殖,改变食物链的结构,使得铜绿微囊藻成为优势藻种。微囊藻毒素不仅对水体中其他生物具有危害作用,而且还对湖泊、河流生态、牲畜和人类水源供给带来负面影响。

[0004] 目前国内外对水体中微囊藻毒素的检测方法主要有生物毒理法、化学分析法和生物化学分析法等。随着对核酸检测技术的深入研究,现在已基本清楚编码微囊藻毒素合成酶的基因。利用产毒基因可以合成特异性引物和探针,建立分子生物学检测法来检测和鉴别环境水样中的低浓度的产毒株。实时定量PCR检测法可以灵敏、快速、准确、高效地检测出物种,它对仪器没有很高的要求,特别是在样品的前处理时间和需要采集样品的量上,可以节省大量的人力和时间。

[0005] 中国专利CN 104131066 A公开了一种利用藻毒素产毒基因研究氮磷对藻毒素生成影响的方法,该方法通过对添加不同浓度的氮磷培养铜绿微囊藻,检测微囊藻毒素的量以及微囊藻毒素产毒基因mcyB的拷贝数,建立了不同氮或磷的浓度、微囊藻毒素含量以及藻毒素合成酶基因mcyB拷贝数之间的相关性。从而可以通过检测基因拷贝数来研究藻毒素的含量。

[0006] 上述现有技术虽然能够通过检测产毒基因的拷贝数以及氮磷的浓度来检测氮磷对藻毒素生成的影响规律,但是该方法在测定藻毒素浓度时,需要应用固相萃取对样品进行预处理,此法耗时较长;该方法应用高效液相色谱仪测定微囊藻毒素浓度,需要对操作人员进行技术培训,此法依赖于微囊藻毒素标准样品,目前已经发现80多种微囊藻毒素,多数标样很难获得而且价格昂贵,限制了高效液相色谱的进一步应用;该方法直接提取样品中的DNA,以DNA作为实时定量PCR的模板,导致扩增效率低。

发明内容

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提出了一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,该方法特异性强、灵敏度较高,所需时间比较短、操作比较简单,所需仪器设备和试剂相对简单。

[0008] 为了达到上述目的,采用的技术方案为:

[0009] 一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法,该方法通过往培养液中加入不同浓度的氯离子和硫酸根,检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数,建立不同浓度的氯离子或硫酸根、微囊藻毒素含量以及藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数之间的相关性,最终通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究藻毒素的含量,包括以下步骤:

[0010] (1),用不同浓度的氯离子和硫酸根培养铜绿微囊藻培养液,从所述铜绿微囊藻培养液中收集藻细胞;

[0011] (2),提取上述步骤(1)中收集的藻细胞内的总RNA,并对提取的总RNA进行反转录,合成cDNA;

[0012] (3),以上述步骤(2)合成的cDNA为模板进行PCR扩增,引物信息如下:

[0013] 上游引物:5'-GCCACAAAACCCCAACTC-3';(SEQ 1DNO.1)

[0014] 下游引物:5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCTCT-3';(SEQ 1DNO.2)

[0015] (4),对目标基因进行纯化;

[0016] (5),进行质粒转化,制备质粒标准品;

[0017] (6),建立上述步骤(5)制备的标准品的浓度与临界循环数对应的一元线性回归曲线,将所述一元线性回归曲线作为标准曲线;

[0018] (7),对待测样品进行定量PCR测定,根据上述步骤(6)得到的标准曲线确定待测样品的DNA浓度;

[0019] (8),应用酶联免疫吸附法对待测样品中的微囊藻毒素进行检测;

[0020] (9),对上述步骤(7)和步骤(8)的结果进行相关性分析,通过测定mcyD基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。

[0021] 作为优选,步骤(1)的具体步骤为:取不同浓度的氯离子和硫酸根培养铜绿微囊藻培养液,用离心机离心后,去掉上清液,用磷酸缓冲盐溶液将藻细胞转移至离心管中,在4℃的温度下离心10分钟,去掉上清液,收集藻细胞,将收集到的藻细胞放于-80℃的冰箱中,用于后续操作。

[0022] 作为优选,步骤(2)的具体步骤为:利用RNA提取试剂盒提取步骤(1)中收集的藻细胞内的总RNA,应用专用于实时定量PCR的反转录试剂盒进行RNA的反转录,合成cDNA。

[0023] 作为优选,步骤(3)的具体步骤为:以步骤(2)中合成的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50μL,引物信息如下:

[0024] 上游引物:5'-GCCACAAAACCCCAACTC-3';(SEQ 1DNO.1)

[0025] 下游引物:5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCTCT-3';(SEQ 1DNO.2)

[0026] 反应程序为:95℃预变性5min,随后94℃30s,退火温度60℃40s和72℃延伸40s,进行30个循环,最终72℃延伸10min,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0027] 作为优选,步骤(4)的具体步骤为:利用Axygen的DNA柱式胶回收试剂盒进行胶回收,对目标基因进行纯化,通过1.5% (wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

[0028] 作为优选,步骤(5)的具体步骤为:将步骤(4)中纯化的DNA插入质粒载体pMD18-T中,并进一步转化到DH5 α 感受态大肠杆菌溶液中,然后涂布到加入Amp抗性的LB固体培养基上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落,测定质粒浓度后,梯度稀释,将稀释后的质粒作为标准样品。

[0029] 作为优选,步骤(6)的具体步骤为:建立标准品的浓度与临界循环数对应的一元线性回归曲线,将得到的一元线性回归曲线作为标准曲线。

[0030] 作为优选,步骤(7)的具体步骤为:对待测样品进行定量PCR的测定,根据步骤(6)得到的标准曲线确定待测样品中的DNA浓度。

[0031] 作为优选,步骤(8)的具体步骤为:应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定微囊藻毒素含量,取50毫升藻细胞培养液,4℃条件下10000转离心10分钟,收集上清液,用于测定培养液中微囊藻毒素含量;用PBS缓冲液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,4℃条件下10000转离心10分钟,洗涤一次,用1毫升PBS缓冲液悬浮沉淀的藻细胞,液氮反复冻融三次,4℃条件下10000转离心10分钟,收集上清液,用于测定铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素含量;每个样品设置三个平行样,用ELISA试剂盒测定微囊藻毒素含量,在测定样品中微囊藻毒素含量前,需要进行预实验,以确定样品稀释倍数,使得微囊藻毒素测定值在试剂盒检测范围内,最后计算时乘以稀释倍数,即可算出样品中实际微囊藻毒素含量。

[0032] 作为优选,步骤(9)的具体步骤为:对步骤(7)和步骤(8)的结果进行相关性分析,建立不同浓度氯离子和硫酸根培养的铜绿微囊藻中藻毒素产生量与mcyD基因拷贝数的关系,利用上述步骤中藻毒素产生量与mcyD基因拷贝数的关系,通过测定mcyD基因拷贝数来确定不同培养条件下藻毒素的生成量。

[0033] 本发明的有益效果是:

[0034] 1、本发明提供的方法通过往培养液中加入不同浓度的氯离子和硫酸根,检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数,建立一种通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究氯离子、硫酸根对藻毒素生成产生影响的方法,该方法特异性强、灵敏度较高,所需时间比较短、操作比较简单,所需仪器设备和试剂相对简单。

[0035] 2、本发明提供的方法收集样品利用的是RNA提取试剂盒提取藻细胞的总RNA,然后应用专用于实时定量PCR的反转录试剂盒,进行RNA的反转录,合成cDNA,以cDNA作为实时定量PCR的模板,以cDNA为模板,主要是检测mcyD基因的转录水平,是检测mcyD基因的mRNA的拷贝数,扩增的目的产物比较小,且扩增效率较高。

[0036] 3、本发明提供的方法以藻毒素产毒基因mcyD来检测外界因素对藻毒素产生的影响,MC由微囊藻毒素基因簇编码生成,基因簇位于染色体上,包含由10个基因组成的两个方向相反的操纵子,分别为mcyABC和mcyDEFGH1J,其中,mcyD基因参与编码合成Adda,而Adda与MC的毒性密切相关,因此可以通过检测mcyD基因的拷贝数来检测藻毒素的产生,检测结果更准确。

[0037] 4、本发明提供的方法应用酶联免疫吸附法测定微囊藻毒素含量,此种检测方法一般在两个小时内就可完成,可一次性的大规模检测样品,具有快速、灵敏、经济的优点。

具体实施方式

[0038] 以下通过实施例对本发明作进一步阐述,但不作为对本发明的限定。

[0039] 实施例1

[0040] 用不同浓度的氯离子培养铜绿微囊藻,本实施例中氯离子的浓度分别为:0、50、100、200和500毫克/升,其产生微囊藻毒素的含量与藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数之前的相关性为: $y=kx+b$,其中, y 为藻毒素含量,单位为 $\mu\text{g/L}$, x 为藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数,单位为copies/mL, k 和 b 为常数。

[0041] 用不同浓度的氯离子作用铜绿微囊藻,取25毫升铜绿微囊藻培养液,用10000转/分钟离心机离心10分钟,去掉上清液。

[0042] 用磷酸缓冲盐溶液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,4℃条件下10000转离心10分钟,去掉上清液,收集藻细胞,将藻细胞放于-80℃冰箱,用于后续操作。

[0043] 利用RNA提取试剂盒对上述步骤收集的藻细胞进行细胞内总RNA的提取。

[0044] 应用专用于实时定量PCR的反转录试剂盒,进行RNA的反转录,合成cDNA。

[0045] 以上述步骤合成的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50 μL (TakaRa Ex Taq HS 0.25 μL ,10 $\times$ Ex Taq Buffer 5 μL ,dNTP Mixture 4 μL ,cDNA模板4 μL ,上、下游引物各1 μL ,其余用灭菌蒸馏水补齐),引物信息如下:

[0046] 上游引物:5'-GCCACAAAACCCCAACTC-3'; (SEQ IDNO.1)

[0047] 下游引物:5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCTCT-3'; (SEQ IDNO.2)

[0048] 反应程序为:95℃预变性30s,60℃30s,72℃1min,30个循环,72℃延伸10min,通过1.5% (wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0049] 对目标基因进行纯化:利用Axygen的DNA柱式胶回收试剂盒进行胶回收,对目标基因进行纯化,通过1.5% (wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

[0050] 质粒转化过程:将纯化后的DNA插入质粒载体pMD18-T中,并进一步转化到DH5 α 感受态大肠杆菌溶液,然后涂布到加入Amp抗性的LB固体培养基上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落。

[0051] 利用挑选出的白色菌落提取质粒,测定质粒浓度后,梯度稀释,将稀释后的质粒作为标准样品,建立标准品的浓度与临界循环数对应的一元线性回归曲线,即得到标准曲线。

[0052] 用待测样品替代上述步骤中的标准品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定样品中的DNA浓度;按照SYBR[®]Premix Ex Taq[™]试剂盒说明进行操作,加入实时定量PCR所需试剂,反应体系为20 μL ,2 μL DNA样品。应用ABI公司的Stepone plus Detection System进行实时定量PCR反应,采用两步法进行PCR扩增,反应条件为:预变性,1个循环,95℃30s;PCR反应,40个循环,95℃5s,60℃30s。溶解曲线分析发现,所有目的基因均呈现单一的峰,并且溶解曲线 T_m 值(80.5℃)一致。标准曲线相关系数为0.9979,根据标准曲线确定样品中mcyD基因的拷贝数。

[0053] 藻毒素的检测:应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定微囊藻毒素(microcystin,MC)含量。取50毫升藻细胞培养液,10000转,4℃条件下离心10分钟,收集上清液,用于测定培养液中微囊藻毒素(extracellular microcystin, Extra MC)含量。用PBS缓冲液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,10000转,4℃离心10分钟,

洗涤一次。用1毫升,PBS缓冲液悬浮沉淀的藻细胞,液氮反复冻融三次。于10000转,4℃离心10分钟,收集上清液,用于测定铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素(intracellular microcystin, Intra MC)含量。每个样品设置三个平行样。按照ELISA试剂盒操作说明测定Extra MC和Intra MC含量。在测定样品中MC含量前,需要进行预实验,以确定样品稀释倍数,使得MC测定值在试剂盒检测范围内,最后计算时乘以稀释倍数,即可算出样品中实际MC含量。

[0054] 对上述步骤的结果进行相关性分析,结果表明,不同浓度的氯离子作用铜绿微囊藻后,其藻毒素含量与mcyD基因拷贝数之间符合线性关系 $y=kx+b$,其中k为0.6013,b为-5.7568。

[0055] 具体实施方式2:

[0056] 用不同浓度的硫酸根培养铜绿微囊藻,本实施例中硫酸根的浓度分别为:0、40、80、150和300毫克/升,其产生微囊藻毒素的含量与藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数之前的相关性为: $y=kx+b$,其中y为藻毒素含量,单位为 $\mu\text{g/L}$,x为藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数,单位为copies/mL,k和b为常数。

[0057] 用不同浓度的硫酸根作用铜绿微囊藻,取25毫升铜绿微囊藻培养液,用10000转/分钟离心10分钟,去掉上清液。

[0058] 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,4℃条件下10000转离心10分钟,去掉上清液,收集藻细胞,将藻细胞放于-80℃冰箱,用于后续操作。

[0059] 利用RNA提取试剂盒对收集的藻细胞进行细胞内总RNA的提取。

[0060] 应用专用于实时定量PCR的反转录试剂盒进行RNA的反转录,合成cDNA。

[0061] 以上述步骤合成的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50 μL (TakaRa Ex Taq HS 0.25 μL ,10 $\times$ Ex Taq Buffer 5 μL ,dNTP Mixture 4 μL ,cDNA模板4 μL ,上、下游引物各1 μL ,其余用灭菌蒸馏水补齐),引物信息如下:

[0062] 上游引物:5'-GCCACAAAACCCCAACTC-3';(SEQ IDNO.1)

[0063] 下游引物:5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCTCT-3';(SEQ IDNO.2)

[0064] 反应程序为:95℃预变性5min,随后94℃30s,退火温度60℃40s和72℃延伸40s,进行30个循环,最终72℃延伸10min,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0065] 对目标基因进行纯化:利用Axygen的DNA柱式胶回收试剂盒进行胶回收,对目标基因进行纯化,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

[0066] 质粒转化过程:将上述步骤中纯化后的DNA插入质粒载体pMD18-T中,并进一步转化到DH5 α 感受态大肠杆菌溶液,然后涂布到加入Amp抗性的LB固体培养基上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落。

[0067] 利用上述步骤中的白色菌落提取质粒,测定质粒浓度后,梯度稀释,将稀释后的质粒作为标准样品,建立标准品的浓度与临界循环数对应的一元线性回归曲线,即得到标准曲线。

[0068] 用待测样品替代上述步骤中的标准品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定样品中的DNA浓度;按照SYBR[®]Premix Ex Taq[™]试剂盒说明进行操作,加入实时定量PCR所需试剂,反应体系为20 μL ,2 μL DNA样品。应用ABI公司的Stepone plus Detection System进行

实时定量PCR反应,采用两步法进行PCR扩增,反应条件为:预变性,1个循环,95℃30s;PCR反应,40个循环,95℃5s,60℃30s。溶解曲线分析发现,所有目的基因均呈现单一的峰,并且溶解曲线T_m值(80.5℃)一致,标准曲线相关系数为0.9979,根据标准曲线确定样品中mcyD基因的拷贝数。

[0069] 藻毒素的检测:应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定微囊藻毒素(microcystin, MC)含量。取50毫升藻细胞培养液,10000转,4℃条件下离心10分钟,收集上清液,用于测定培养液中微囊藻毒素(extracellular microcystin, Extra MC)含量。用PBS缓冲液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,10000转,4℃离心10分钟,洗涤一次。用1毫升, PBS缓冲液悬浮沉淀的藻细胞,液氮反复冻融三次。于10000转,4℃离心10分钟,收集上清液,用于测定铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素(intracellular microcystin, IntraMC)含量。每个样品设置三个平行样。按照ELISA试剂盒操作说明测定Extra MC和Intra MC含量。在测定样品中MC含量前,需要进行预实验,以确定样品稀释倍数,使得MC测定值在试剂盒检测范围内,最后计算时乘以稀释倍数,即可算出样品中实际MC含量。

[0070] 对上述步骤的结果进行相关性分析。结果表明,不同浓度的硫酸根作用铜绿微囊藻后,其藻毒素含量与mcyD基因拷贝数之间符合线性关系 $y=kx+b$,其中k为0.4283, b为-3.2923。

[0071] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何本领域技术人员均可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰与改变。因此,本发明的权利保护范围,应如权利要求书所列。

序列表

<110> 上海城市水资源开发利用国家工程中心有限公司

<120> 一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法

<130> 2017

<160> 2

<170> SLP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gcccacaaaa ccccaactc 19

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tttctgccta atcttttccc ctct 24

专利名称(译)	一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法		
公开(公告)号	CN107604051A	公开(公告)日	2018-01-19
申请号	CN2017110815782.8	申请日	2017-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	上海城市水资源开发利用国家工程中心有限公司 上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海城市水资源开发利用国家工程中心有限公司 上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海城市水资源开发利用国家工程中心有限公司 上海交通大学		
[标]发明人	陈蕾 何义亮 姜蕾 杨坤 刘爽 严棋		
发明人	陈蕾 何义亮 姜蕾 杨坤 刘爽 严棋		
IPC分类号	C12Q1/6851 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6851 C12Q1/689 C12Q2600/158 G01N33/53 G16B40/00 C12Q2545/114 C12Q2537/16 C12Q2531/113		
优先权	201710652425.4 2017-08-02 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明通过了一种利用藻毒素产毒基因研究氯离子和硫酸根对微囊藻毒素生成影响的方法，该方法通过往培养液中加入不同浓度的氯离子和硫酸根，检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数，建立不同浓度的氯离子或硫酸根、微囊藻毒素含量以及藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数之间的相关性，最终通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究藻毒素的含量。该方法特异性强、灵敏度较高，所需时间比较短、操作比较简单，所需仪器设备和试剂相对简单。