



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102392076 A

(43) 申请公布日 2012.03.28

(21) 申请号 201110378908.2

(22) 申请日 2011.11.24

(71) 申请人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌东湖南路 7 号

(72) 发明人 王中杰 宋高飞 虞功亮 李仁辉

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法,其步骤:A、采集待测水样,经醋酸纤维素膜过滤,将过滤到的藻进行总基因组 DNA 的提取和纯化;B、定性 PCR 的反应体系为:合成相关单萜环化酶基因,以产 2-MIB 蓝藻 DNA 为阳性对照,双蒸水为阴性对照;C、定性 PCR 的反应程序为:94° C 预变性 3min,接着循环,循环过后最后延伸;D、定性 PCR 产物和阳性对照、阴性对照;E、荧光定量 PCR 的反应体系,阴性模板对照加无菌双蒸水;F、荧光定量 PCR 的反应程序;G、标准曲线的制作;H、根据待测样品的 Ct 值和标准曲线计算原水样中产 2-MIB 蓝藻的浓度。方法易行,操作简便,具有很高的灵敏度和准确度,可以快速、准确的定量水样中产 2-MIB 蓝藻的浓度。

1. 一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法,其步骤是:

A、采集待测水样,经 0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤,将过滤到的藻进行总基因组 DNA 的提取和纯化,将提取到的 DNA 溶于无菌双蒸水中,置 -20°C 保存;

B、定性 PCR 的反应体系为:2 \times PCR 反应体系 10 μl ,特异性扩增 2-MIB 合成相关单萜环化酶基因的正反引物各 1 μl ,待检测的 DNA 1 μl ,以双蒸水校正至 20 μl 体积,所用引物为:CITf5-CAGCACGACAGCTTCTACACCT-3, CITr 5-GCCGCAATCTGTAGCACCAT-3,以产 2-MIB 蓝藻 DNA 为阳性对照,双蒸水为阴性对照;

C、定性 PCR 的反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min,接着 40 个循环,每个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s、58 $^{\circ}\text{C}$ 30s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s,循环过后最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5min;

D、定性 PCR 产物和阳性对照、阴性对照一起进行 2% w/w 琼脂糖凝胶电泳,电泳过后溴化乙锭染色,紫外灯下观测,目标条带长度为 206bp;

E、荧光定量 PCR 的反应体系:反应体系 20 μl ,含 Taqman reaction Mix 10 μl ,Taqman Probe 0.4 μl Ctaq:5-CAGCACGACAGCTTCTACACCTCC-3,5 端 FAM 修饰,3 端 TAMRA 修饰,特异性正反向引物各 5pmol CRTf:5-CTGTTACGCCACCTTCTYTATGT-3, CRTTr:5-ACSGAAAGGAGATCGTTGACC-3,目标产物大小为 87bp,待测样品总 DNA 1 μl ,用双蒸水补足反应体系,阴性模板对照加无菌双蒸水;

F、荧光定量 PCR 的反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min,接着 40 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s、56 $^{\circ}\text{C}$ 30s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s,每个循环完成后进行一次荧光检测,反应完成后记录各个样品的 Ct 值;

G、标准曲线的制作:取已知浓度的产 2-MIB 假鱼腥藻做为标准藻株,提取其基因组总 DNA,10 倍梯度稀释做为标准模板:10⁸-10³ 拷贝/ μl ,依照上述荧光定量 PCR 的体系步骤 5 和步骤 6 与待测样品同时进行定量 PCR 扩增,反应结束后,根据各个浓度梯度的 Ct 值和浓度值绘制荧光定量 PCR 标准曲线;

H、根据待测样品的 Ct 值和标准曲线计算样品 2-MIB 基因的拷贝数,进而推算原水样中产 2-MIB 蓝藻的浓度。

一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及水环境监测、水生态学、微生物有害代谢物等领域,更具体涉及一种采用 PCR(聚合酶链式反应)和荧光定量 PCR 对环境中的产 2-MIB 蓝藻进行检测的方法,适用于对水库、湖泊和河流等饮用水源地及水生生态系统中的藻源性 2-MIB 进行预警和快速定性、定量。

背景技术

[0002] 近年来,随着水体富营养化的日益加重,蓝藻水华在全球尤其是我国大面积爆发。水华问题已经成为我国环境保护领域所面临的重大问题。蓝藻水华的危害表现在很多方面,其中对人类健康和饮用水有直接威胁的藻毒素问题已经受到了极大的关注。除各种藻毒素外,很多蓝藻种类还分泌具有异味的挥发性次生代谢产物,使水体和水产品产生令人反感的臭味。水体异味问题不仅大大降低了饮用水的水质,还对渔业、生态景观和旅游业等造成了巨大的损失。由蓝藻所引起的藻源性异味次级代谢产物和藻毒素一起已经成为全球普遍存在的严重的环境问题。近年来,随着对异味问题的重视,已经有越来越多的水体异味问题的报道,其中对社会经济造成极大影响的当属 2007 年太湖饮用水危机。

[0003] 具土霉味的萜类化合物 2-MIB(2-甲基异茨醇)被认为是引起各种淡水水体异味问题的主要原因之一。作为富营养化水体中重要的生物类群,蓝藻通常被认为是 2-MIB 合成和释放的主要生物类群。通过传统的形态学观察等方法一般并不能有效地区分蓝藻是否产 2-MIB。申请者最近的研究成果表明,在蓝藻中 2-MIB 是由一个基因簇(含有一个甲基化酶基因和一个单萜环化酶基因)调控合成而来,只有具有此基因簇的蓝藻藻株才能够产生 2-MIB。目前,多种基于基因的产毒蓝藻的分子检测方法已经建立,而关于产 2-MIB 蓝藻的分子检测方法尚未有报道。由于具有简便、快捷、高灵敏度等优势,基于 PCR 的分子方法对产 2-MIB 蓝藻的鉴定具有独特的优势。

[0004] 传统的水环境中 2-MIB 浓度的检测主要基于气象色谱-质谱联用的化学分析技术,这类技术虽然能准确定量浓度,但是其缺点在于相对繁琐、昂贵,并且具有一定的检测限。在水体中 2-MIB 的主要浓度主要由具 2-MIB 合成能力的蓝藻的生物量决定。从分子生物学的角度来看,水体中 2-MIB 合成基因的拷贝数在一定程度上最终决定了 2-MIB 的浓度。普通的 PCR 检测技术可以定性检测蓝藻是否产 2-MIB 和环境中是否有产 2-MIB 蓝藻,不能定量检测水体中产 2-MIB 蓝藻的浓度。因此,开发一种基于 2-MIB 合成基因-单萜环化酶基因-的定性 PCR 和基于分子探针(TaqMan)的实时荧光定量 PCR 检测技术快速、高灵敏度的定性和定量环境中产 2-MIB 蓝藻的浓度对水质监测和预警具有非常重要的现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对现有的水体异味监测需求,是在于提供了一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法,方法易行,操作简便, TaqMan

qRT-PCR 具有很高的灵敏度和准确度,可以快速、准确的定量水样中产 2-MIB 蓝藻的浓度,能够对环境或纯培养的产 2-MIB 蓝藻定性和定量,可用于对各类富营养化淡水水体中具 2-MIB 产生能力的蓝藻进行快速定量。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术措施:

[0007] 采集环境样本(水样)并提取基因组 DNA,采用分子信标荧光定量 PCR(TaqMan qRT-PCR)的方法对 2-MIB 合成相关单萜环化酶基因片段进行定量检测,根据标准曲线和待测样本的 Ct 值计算单位体积样本中单萜环化酶基因的拷贝数和产 2-MIB 蓝藻的浓度。

[0008] 一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法,其步骤如下:

[0009] 1、采集一定体积(300-1000ml)的待测水样,经 0.45 μm 的醋酸纤维素膜过滤,将过滤到的藻进行总基因组 DNA 的提取和纯化。将提取到的 DNA 溶于一定体积(30-50 μl)的无菌双蒸水中,置 -20℃ 保存。

[0010] 2、定性 PCR 的反应体系为:2×PCR 反应体系(Mix)10 μl,特异性扩增 2-MIB 合成相关单萜环化酶基因的正反引物各 1 μl,待检测的 DNA 1 μl,以双蒸水校正至 20 μl 体积。所用引物为:CITf(5-CAGCACGACAGCTTCTACACCT-3),CITr(5-GCCGCAATCTGTAGCACCAT-3)。以产 2-MIB 蓝藻 DNA 为阳性对照,双蒸水为阴性对照。

[0011] 3、定性 PCR 的反应程序为:94℃ 预变性 3min,接着 40 个循环,每个循环 94℃ 30s、58℃ 30s 和 72℃ 30s,循环过后最后 72℃ 延伸 5min。

[0012] 4、定性 PCR 产物和阳性对照、阴性对照一起进行 2% (w/w) 琼脂糖凝胶电泳,电泳过后溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观测。目标条带长度为 206bp。

[0013] 5、荧光定量 PCR 的反应体系:反应体系 20 μl,含 Taqman reaction Mix 10 μl, Taqman Probe 0.4 μl (Ctaq:5-CAGCACGACAGCTTCTACACCTCC-3,5 端 FAM 修饰,3 端 TAMRA 修饰),特异性正反向引物各 5pmol (CRTf:5-CTGTTACGCCACCTTCTYTATGT-3, CRTTr:5-ACSGAAAGGAGATCGTTGACC-3,目标产物大小为 87bp),待测样品总 DNA 1 μl,用双蒸水补足反应体系。阴性模板对照加无菌双蒸水。

[0014] 6、荧光定量 PCR 的反应程序为:94℃ 预变性 5min,接着 40 个循环,每个循环包括 94℃ 30s、56℃ 30s 和 72℃ 30s,每个循环完成后进行一次荧光检测。反应完成后记录各个样品的 Ct 值。

[0015] 7、标准曲线的制作:取已知浓度的产 2-MIB 假鱼腥藻做为标准藻株,提取其基因组总 DNA,10 倍梯度稀释做为标准模板(10^8 - 10^3 拷贝/μl)。依照上述荧光定量 PCR 的体系(步骤 5)和程序(步骤 6)与待测样品同时进行定量 PCR 扩增。反应结束后,根据各个浓度梯度的 Ct 值和浓度值绘制荧光定量 PCR 标准曲线。

[0016] 8、根据待测样品的 Ct 值和标准曲线计算样品 2-MIB 基因的拷贝数,进而推算原水样中产 2-MIB 蓝藻的浓度。

[0017] 上诉所涉及到的引物全部为本发明所设计,并在 Invitrogen(上海)公司合成,经 PAGE 纯化得到。引物使用浓度为 10nmol/ml。

[0018] 本发明的方法相较于传统方法具有显著的优点和效果:

[0019] 传统的形态学观察等方法并不能有效区分样品中有没有产 2-MIB 蓝藻,需要将样品中的各个蓝藻分离纯培养出来才能测定,步骤繁琐、耗时。应用本发明的定性方法可以快

速确定样品中有无产 2-MIB 种类。TaqMan qRT-PCR 具有很高的灵敏度和准确度,可以快速、准确的定量水样中产 2-MIB 蓝藻的浓度。可由于具有极高的灵敏度,在传统的分析方法尚不能检测到水样中的 2-MIB 时,本方法即可检测、定量出 2-MIB 蓝藻,因此在水质预警系统中具有很高的应用价值。本发明的方法重复性好,对样品的定性和定量分别在 3 小时和 12 小时之内就可完成,而且一次可以处理大量样品。

附图说明

[0020] 图 1 为一种产 2-MIB 蓝藻 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法获得的标准曲线示意图。

[0021] 如标曲图所示,本发明所用引物扩增效率高 ($E = 98.9\%$),所得的标准曲线线性关系良好 ($R^2 = 0.998$)。

具体实施方式

[0022] 实施例 1:

[0023] 一种产 2-MIB 蓝藻的 PCR 定性和 TaqMan 荧光定量 PCR 定量的检测方法,其步骤是:

[0024] 1、样品采集和 DNA 提取:

[0025] 采集 2010 年 7、9 月份陆水水库(湖北赤壁)水样进行产 2-MIB 蓝藻的定量,采样点为 6 个。

[0026] 将 300mL 水样经 $0.45\mu\text{m}$ 醋酸纤维素膜过滤,对滤膜进行总 DNA 的提取和纯化。

[0027] 2、定性 PCR:

[0028] 采用引物 CITf 和 CITr 对每个样点进行产 2-MIB 蓝藻的定性分析,反应体系和程序为: $2\times$ PCR 反应体系 (Mix) $10\mu\text{l}$, CITf 和 CITr 各 $1\mu\text{l}$, 待检测的 DNA $1\mu\text{l}$, 以双蒸水校正至 $20\mu\text{l}$ 体积; 94°C 预变性 3min, 接着 40 个循环, 每个循环 94°C 30s、 58°C 30s 和 72°C 30s, 循环过后最后 72°C 延伸 5min。

[0029] 定性 PCR 的结果显示在所有的样品中均能检测到 2-MIB 合成基因的存在,预示着这些样点全部存在着产 2-MIB 蓝藻。

[0030] 3、荧光定量 PCR:

[0031] 采用 TaqMan 分子探针法对样品中的 2-MIB 基因数量进行定量: 反应体系 $20\mu\text{l}$, 含 Taqmanreaction Mix $10\mu\text{l}$, Taqman Probe $0.4\mu\text{l}$ (Ctaq), 特异性正反向引物各 5pmol (CRTf, CRTTr); 94°C 预变性 5min, 接着 40 个循环, 每个循环包括 94°C 30s、 56°C 30s 和 72°C 30s, 每个循环完成后进行一次荧光检测。

[0032] 4、标准曲线的制作:

[0033] 取已知浓度的产 2-MIB 假鱼腥藻做为标准藻株, 提取其基因组总 DNA, 10 倍梯度稀释做为标准模板 (10^8 - 10^3 拷贝 / μl)。依照上述步骤 2 荧光定量 PCR 的体系和程序与待测样品同时进行定量 PCR 扩增。反应结束后, 根据各个浓度梯度的 Ct 值和浓度值绘制荧光定量 PCR 标准曲线。

[0034] 5、样品中 2-MIB 浓度的计算:

[0035] 本次实验的标准曲线的计算公式为:

[0036] 拷贝数 = 5.0×10^x , $x = 12e^{-0.667Ct}$ Ct 值为实验所得到的值。

[0037] 将荧光定量中各个样品的 Ct 值代入标准曲线公式中即可得出原始样品中 2-MIB 基因的准确的拷贝数。

[0038] 陆水水库 2010 年 7 月、9 月各个样点的 2-MIB 基因拷贝数如下：

样点	拷贝数 (copies/L)	
	7 月	9 月
1#	2.877E+04	3.328E+05
2#	1.862E+06	2.418E+04
3#	9.687E+04	3.622E+05
4#	4.815E+05	3.806E+05
5#	1.106E+05	1.833E+05
6#	1.769E+05	1.962E+05

[0040] 实验结果表明：在陆水水库广泛分布着产 2-MIB 蓝藻，在各个样点都检测到了相应的 2-MIB 合成基因。7 月和 9 月各个样点 2-MIB 基因的拷贝数如上所示，在这两个月中，大部分位点的拷贝数达到了 10^5 的数量级，预示着在这些样点即将或已经产生了可感觉到的土霉臭味，需要加强监测。

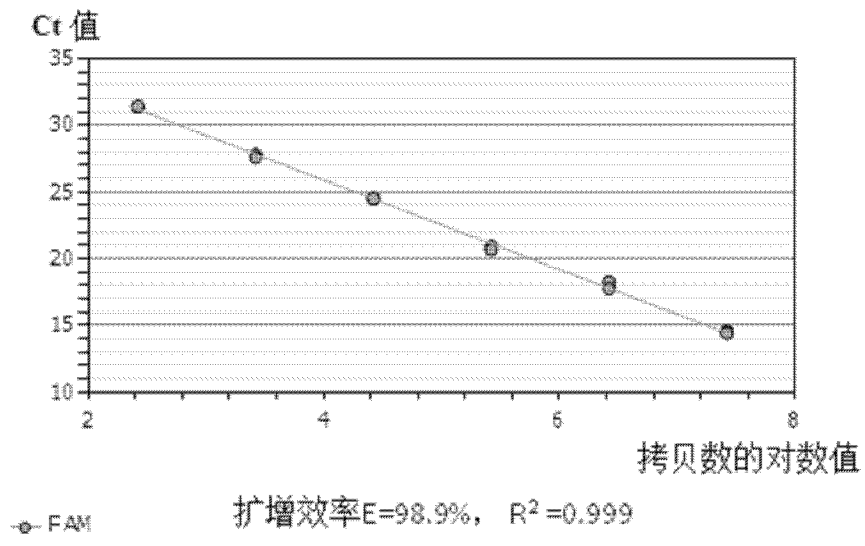


图 1