

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104131066 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 05

(21) 申请号 201310159569. 8

(22) 申请日 2013. 05. 03

(71) 申请人 中国科学院生态环境研究中心
地址 100085 北京市海淀区双清路 18 号

(72) 发明人 刘会娟 苏春风 柏耀辉 赵旭
兰华春 曲久辉

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 30/06 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页
序列表1页

(54) 发明名称

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

(57) 摘要

本发明提供一种研究氮磷对微囊藻毒素生成的影响的方法。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。本发明建立了一种通过对基因拷贝数的检测来研究氮磷对藻毒素生成的影响的方法。运用该方法只需要检测产毒基因的拷贝数以及氮磷的浓度即可,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氮磷对藻毒素生成影响的方法,其特征在于,该方法按下列步骤顺序进行:

A. 取不同氮磷浓度条件下培养的 10 ml~20 ml 铜绿微囊藻的藻液,用 7000 转/分钟离心 5 分钟,去掉上清液;

B. 加入 1-5 ml 无菌的去离子水,充分混匀,用 7000 转/分钟离心 5 分钟,去掉上清液,得到藻细胞;

C. 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒对步骤 B 中的藻细胞进行基因提取。

D. 加入 mcyB 基因的引物,引物信息如下:

F: 5' - TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA -3'

R: 5' -AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC-3'

用 DNA 聚合酶链式扩增反应(PCR)仪,进行 DNA 扩增;采用下列参数:95 °C 预变性 5 min,随后 95 °C 30 s,退火温度 56 °C 30 s 和 72 °C 延伸 45 s,进行 30 个循环,最终 72 °C 延伸 10 min。通过 1.2 %(wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

E. 对目标基因进行纯化:利用 QIAquick Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒进行凝胶回收,对目标基因进行纯化,通过 1.2% (wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

F. 质粒转化过程:将步骤 E 中纯化后的 DNA 插入质粒载体 pMD18-T 中,并进一步转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞中,随后涂布到加入了 IPTG、X-Gal 和 Amp 的 LB 固体平板上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落。

G. 利用步骤 F 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。对环境样品进行定量 PCR 的测定。定量 PCR (ABI7300, USA) 采用 SYBR green I 法,选用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,按照说明书采用 20 μl 反应体系,2 μl DNA 样品。采用 3 步法,在定量 PCR 仪上进行,95 °C 预变性 30 s,95 °C 15s,退火 30 s,温度同普通 PCR,72 °C 延伸 30 s,此时采集荧光信号,40 个循环后,再接溶解程序,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s。标准曲线要求相关系数大于 0.99,融解曲线 Tm 值一致,根据标准曲线确定样品中的 DNA 浓度。

H. 藻毒素的提取及定量。

取 50~100 ml 藻液,用溶剂过滤器过滤,滤膜上的细胞用于提取细胞内毒素。滤膜于 -20 °C 下保存。

水中藻毒素的提取:采用预先活化的固相萃取 C18 小柱(使用前用 10 ml 色谱纯甲醇、10 ml 超纯水进行活化,活化过程中 C18 小柱中的吸附剂不能与空气接触)对滤液进行富集。然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10% 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80 % 甲醇溶液分 3 次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

细胞内毒素的提取:采用反复冻融法进行胞内藻毒素的提取。在 -20°C 下冷冻,室温下融化,反复三次后,用 80 % 甲醇溶液振荡提取 3 次,收集 3 次溶液,水浴使溶液中的甲醇挥发,经 C18 小柱富集,然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10 % 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80% 甲醇溶液分三次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

I. 对步骤 G 和步骤 H 的结果进行相关性分析。建立不同氮磷浓度培养的铜绿微囊藻中

藻毒素产生量与 mcyB 基因的拷贝数的关系。

J. 利用上述藻毒素产生量与 mcyB 基因拷贝数的关系,可以通过测定 mcyB 基因拷贝数来确定不同培养条件下藻毒素的产生量。

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

技术领域

[0001] 本发明涉及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,具体涉及到蓝藻中的铜绿微囊藻,包含藻液总 DNA 提取方法、藻毒素提取以及检测方法。

背景技术

[0002] 随着工农业生产的发展,大量氮、磷被排入水体中,导致水体富营养化不断加剧。水体的富营养化危害最大的一个表征就是蓝藻水华的出现。铜绿微囊藻是蓝藻水华的优势藻种,其释放的次级代谢产物尤其是藻毒素,对人类和生物的安全构成了严重的威胁。藻毒素(尤其是微囊藻毒素)因能引起动植物中毒,诱发人类肝癌而引起人们的高度重视。微囊藻毒素(microcystins, MCs)是一类环式七肽化合物,其分子量为 500~4000 Da,目前为止已发现 80 多种微囊藻毒素异构体,其中含量较多、毒性较大的有 MC-LR。多年来,美国、澳大利亚、巴西等国都报道过微囊藻毒素所致的人畜中毒事件。在我国太湖、巢湖、滇池也频繁发生蓝藻水华。世界卫生组织通过制定严格的各类水中藻毒素-LR 的限量标准来减轻其危害。

[0003] 影响藻毒素产生的因素很多,主要集中在遗传因素和环境因素。而环境因素中氮、磷是引起水体富营养化的主要因素,同时也能影响藻毒素的产生。磷通常是湖泊中的限定因子,因而较小的磷的变化就能影响蓝藻生长和毒素的产生。通常在磷浓度较低时毒素含量较低,也有报道在磷限定的条件下,单位干重藻细胞毒素含量增加。氮元素对铜绿微囊藻的影响,主要是在氮浓度比较高的条件下,藻毒素的含量最高。也有人认为氮为微囊藻产生藻毒素提供所需要的氮源。而与藻毒素合成有关的基因 mcyB,仅存在于产生藻毒素的微囊藻株系中,可以通过检测基因 mcyB 的拷贝数来检测藻毒素的产生。虽然很多人研究了氮磷对铜绿微囊藻产生藻毒素的影响,但很少与藻毒素合成酶基因联系起来。本发明提出了一种利用藻毒素合成酶基因研究氮磷对藻毒素生成影响的方法,综合考虑了氮磷对微囊藻产生藻毒素的影响以及藻毒素合成酶基因拷贝数,发现两者之间存在一定的相关性,利用其相关性可以直接通过检测藻毒素合成酶基因的拷贝数来计算不同培养条件下藻毒素生成量,大大简化了测定藻毒素的过程,简单方便。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种研究氮磷对微囊藻毒素生成影响的方法。该方法通过添加不同的氮磷培养铜绿微囊藻,通过检测微囊藻毒素量以及微囊藻毒素产毒基因 mcyB 的拷贝数,建立了一种通过对基因拷贝数的检测来研究氮磷对藻毒素生成影响的方法。该方法检测所需时间比较短、操作比较简单,所需仪器设备和试剂相对简单。

[0005] 为达到上述目的,本发明具体步骤如下:

[0006] 1、取不同氮磷浓度条件下培养的 10~20 ml 铜绿微囊藻的藻液,用 7000 转/分钟离心 5 分钟,去掉上清液;

[0007] 2、加入 1-5ml 无菌的去离子水,充分混匀,用 7000 转 / 分钟离心 5 分钟,去掉上清液,得到藻细胞;

[0008] 3、利用植物基因组 DNA 提取试剂盒对步骤 2 中的藻细胞进行基因提取。

[0009] 4、加入 mcyB 基因的引物,引物信息如下:

[0010] F: 5' - TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA -3'

[0011] R: 5' -AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC-3'

[0012] 用 DNA 聚合酶链式扩增反应(PCR)仪,进行 DNA 扩增;采用下列参数:95 °C 预变性 5 min,随后 95 °C 30 s,退火温度 56 °C 30 s 和 72 °C 延伸 45 s,进行 30 个循环,最终 72 °C 延伸 10 min。通过 1.2% (wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0013] 5、对目标基因进行纯化;利用 QIAquick Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒进行凝胶回收,对目标基因进行纯化,通过 1.2% (wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

[0014] 6、质粒转化过程:将步骤 5 中纯化后的 DNA 插入质粒载体 pMD18-T 中,并进一步转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞中,随后涂布到加入了 IPTG、X-Gal 和 Amp 的 LB 固体平板上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落。

[0015] 7、利用步骤 6 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。对环境样品进行定量 PCR 的测定。定量 PCR (ABI7300, USA) 采用 SYBR green I 法,选用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,按照说明书采用 20 μl 反应体系,2 μl DNA 样品。采用 3 步法,在定量 PCR 仪上进行,95 °C 预变性 30 s,95 °C 15 s,退火 30 s,温度同普通 PCR,72 °C 延伸 30 s,此时采集荧光信号,40 个循环后,再接溶解程序,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s。标准曲线要求相关系数大于 0.99,融解曲线 Tm 值一致,根据标准曲线确定样品中的 mcyB 基因的拷贝数。

[0016] 8、藻毒素的提取及定量。

[0017] 取 50~100 ml 藻液,用溶剂过滤器过滤,滤膜上的细胞用于提取细胞内毒素。滤膜于 -20 °C 下保存。

[0018] 水中藻毒素的提取:采用预先活化的固相萃取 C18 小柱(使用前用 10ml 色谱纯甲醇、10 ml 超纯水进行活化,活化过程中 C18 小柱中的吸附剂不能与空气接触)对滤液进行富集。然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10 % 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80% 甲醇溶液分 3 次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

[0019] 细胞内毒素的提取:采用反复冻融法进行胞内藻毒素的提取。在 -20 °C 下冷冻,室温下融化,反复三次后,用 80 % 甲醇溶液振荡提取 3 次,收集 3 次溶液,水浴使溶液中的甲醇挥发,经 C18 小柱富集,然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10 % 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80 % 甲醇溶液分三次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

[0020] 9、对步骤 7 和步骤 8 的结果进行相关性分析。建立不同氮磷浓度培养的铜绿微囊藻中藻毒素产生量与 mcyB 基因的拷贝数的关系。

[0021] 10、利用上述藻毒素产生量与 mcyB 基因拷贝数的关系,可以通过测定 mcyB 基因拷贝数来确定不同培养条件下藻毒素的产生量。

[0022] 本发明将不同氮磷浓度对微囊藻毒素产生量与藻毒素合成酶基因 *mcyB* 拷贝数相关联。建立了氮磷浓度、藻毒素含量以及藻毒素合成酶基因 *mcyB* 之间的相关性。建立相关性之后,可以通过测定藻毒素合成酶基因的拷贝数快速监测氮磷对微囊藻产生藻毒素的影响。可以省去提取以及检测藻毒素的繁琐过程,省时省力。

[0023] 具体实施方式 1:

[0024] 1、不同磷浓度培养的铜绿微囊藻,其产生微囊藻毒素量与藻毒素合成酶基因 *mcyB* 拷贝数之间的相关性为: $y = kx + b$, 其中 y 为藻毒素量,单位为 ng/ml, x 为藻毒素合成酶基因 *mcyB* 拷贝数,单位为 coys/ml, k, b 为常数。

[0025] 2、取用一定浓度磷培养的 10 ml~20 ml 铜绿微囊藻的藻液,用 7000 转 / 分钟离心 5 分钟,去掉上清液;

[0026] 3、加入 1-5 ml 无菌的去离子水,充分混匀,用 7000 转 / 分钟离心 5 分钟,去掉上清液,得到藻细胞;

[0027] 4、利用植物基因组 DNA 提取试剂盒对步骤 3 中的藻细胞进行基因提取。

[0028] 5、加入 *mcyB* 基因的引物,引物信息如下:

[0029] F: 5' - TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA -3'

[0030] R: 5' -AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC-3'

[0031] 用 DNA 聚合酶链式扩增反应(PCR)仪,进行 DNA 扩增;采用下列参数:95℃ 预变性 5min,随后 95℃ 30s、退火温度 56℃ 30s 和 72℃ 延伸 45s,进行 30 个循环,最终 72℃ 延伸 10min。通过 1.2%(wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0032] 6、对目标基因进行纯化:利用 QIAquick Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒进行凝胶回收,对目标基因进行纯化,通过 1.2% (wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

[0033] 7、质粒转化过程:将步骤 6 中纯化后的 DNA 插入质粒载体 pMD18-T 中,并进一步转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞中,随后涂布到加入了 IPTG、X-Gal 和 Amp 的 LB 固体平板上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落。

[0034] 8、利用步骤 7 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。对环境样品进行定量 PCR 的测定。定量 PCR (ABI7300, USA) 采用 SYBR green I 法,选用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,按照说明书采用 20 μ l 反应体系,2 μ l DNA 样品。采用 3 步法,在定量 PCR 仪上进行,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,退火 30 s,温度同普通 PCR,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,此时采集荧光信号,40 个循环后,再接溶解程序,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。标准曲线要求相关系数大于 0.99,融解曲线 T_m 值一致,根据标准曲线确定样品中的 *mcyB* 基因的拷贝数。

[0035] 9、藻毒素的提取及定量。

[0036] 取 50~100 ml 藻液,用溶剂过滤器过滤,滤膜上的细胞用于提取细胞内毒素。滤膜于 -20 $^{\circ}$ C 下保存。

[0037] 水中藻毒素的提取:采用预先活化的固相萃取 C18 小柱(使用前用 10ml 色谱纯甲醇、10 ml 超纯水进行活化,活化过程中 C18 小柱中的吸附剂不能与空气接触)对滤液进行富集。然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10% 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80% 甲醇溶液分 3 次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓

缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

[0038] 细胞内毒素的提取:采用反复冻融法进行胞内藻毒素的提取。在 -20 °C 下冷冻,室温下融化,反复三次后,用 80 % 甲醇溶液振荡提取 3 次,收集 3 次溶液,水浴使溶液中的甲醇挥发,经 C18 小柱富集,然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10 % 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80 % 甲醇溶液分三次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

[0039] 10、由步骤 8 和步骤 9 的结果,进行相关性分析。结果表明,该磷浓度条件下培养的铜绿微囊藻,其藻毒素产生量与 mcyB 基因拷贝数之间符合线性关系 $y = kx + b$,其中 $k = 7 \times 10^{-8}$, $b = 5.1218$ 。

[0040] 具体实施方式 2:

[0041] 1、不同氮浓度培养的铜绿微囊藻,其产生微囊藻毒素量与藻毒素合成酶基因 mcyB 拷贝数之间的相关性为: $y = kx + b$,其中 y 为藻毒素量,单位为 ng/ml, x 为藻毒素合成酶基因 mcyB 拷贝数,单位为 coys/ml, k, b 为常数。

[0042] 2、取用一定浓度氮培养的 10~20 ml 铜绿微囊藻的藻液,用 7000 转 / 分钟离心 5 分钟,去掉上清液;

[0043] 3、加入 1-5 ml 无菌的去离子水,充分混匀,用 7000 转 / 分钟离心 5 分钟,去掉上清液,得到藻细胞;

[0044] 4、利用植物基因组 DNA 提取试剂盒对步骤 3 中的藻细胞进行基因提取。

[0045] 5、加入 mcyB 基因的引物,引物信息如下:

[0046] F: 5' - TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA -3'

[0047] R: 5' -AGAGTGGAACAATATGATAAGCTAC-3'

[0048] 用 DNA 聚合酶链式扩增反应(PCR)仪,进行 DNA 扩增;采用下列参数:95 °C 预变性 5 min,随后 95 °C 30 s,退火温度 56 °C 30 s 和 72 °C 延伸 45 s,进行 30 个循环,最终 72 °C 延伸 10 min。通过 1.2%(wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0049] 6、对目标基因进行纯化:利用 QIAquick Gel Extraction Kit 凝胶回收试剂盒进行凝胶回收,对目标基因进行纯化,通过 1.2% (wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认回收是否成功。

[0050] 7、质粒转化过程:将步骤 6 中纯化后的 DNA 插入质粒载体 pMD18-T 中,并进一步转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞中,随后涂布到加入了 IPTG、X-Gal 和 Amp 的 LB 固体平板上,通过蓝白斑筛选,挑选转化了质粒的白色菌落。

[0051] 8、利用步骤 7 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。对环境样品进行定量 PCR 的测定。定量 PCR (ABI7300, USA) 采用 SYBR green I 法,选用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒,按照说明书采用 20 μ l 反应体系,2 μ l DNA 样品。采用 3 步法,在定量 PCR 仪上进行,95 °C 预变性 30 s,95 °C 15 s,退火 30 s,温度同普通 PCR,72 °C 延伸 30 s,此时采集荧光信号,40 个循环后,再接溶解程序,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s。标准曲线要求相关系数大于 0.99,融解曲线 T_m 值一致,根据标准曲线确定样品中的 mcyB 基因的拷贝数。

[0052] 9、藻毒素的提取及定量。

[0053] 取 50~100 ml 藻液,用溶剂过滤器过滤,滤膜上的细胞用于提取细胞内毒素。滤膜

于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。

[0054] 水中藻毒素的提取:采用预先活化的固相萃取 C18 小柱(使用前用 10ml 色谱纯甲醇、10 ml 超纯水进行活化,活化过程中 C18 小柱中的吸附剂不能与空气接触)对滤液进行富集。然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10 % 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80 % 甲醇溶液分 3 次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

[0055] 细胞内毒素的提取:采用反复冻融法进行胞内藻毒素的提取。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻,室温下融化,反复三次后,用 80 % 甲醇溶液振荡提取 3 次,收集 3 次溶液,水浴使溶液中的甲醇挥发,经 C18 小柱富集,然后依次用 10 ml 超纯水,10 ml 10 % 甲醇溶液淋洗 C18 小柱 3 次,消除部分杂质,再用 10~20 ml 80 % 甲醇溶液分三次洗脱萃取柱中的藻毒素至浓缩瓶中,经水浴氮吹后浓缩至 0.5 ml 以下,定容至 0.5 ml,高效液相色谱仪检测。

[0056] 10、由步骤 8 和步骤 9 的结果,进行相关性分析。结果表明,该氮浓度条件下培养的铜绿微囊藻,其藻毒素生成量与 mcyB 基因拷贝数之间符合线性关系 $y = kx + b$,其中 $k = 1 \times 10^{-7}$, $b = -0.7044$ 。

[0001]

核苷酸或氨基酸序列表

mcyB 基因引物序列:

F: 5' - TGGGAAGATGTTCTTCAGGTATCCAA -3'

R: 5' -AGAGTGGAAACAATATGATAAGCTAC-3'