



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107488719 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201710815784.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.09.12

C12Q 1/68(2006.01)

(66)本国优先权数据

C12M 1/34(2006.01)

201710652425.4 2017.08.02 CN

G01N 33/53(2006.01)

G06F 19/24(2011.01)

(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 张东
舒诗湖 王铮 马艳(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

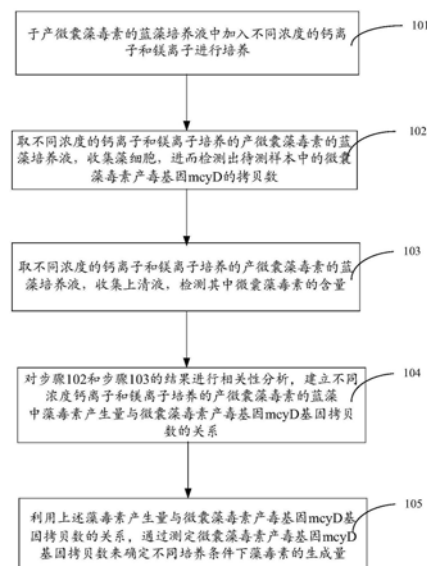
权利要求书2页 说明书12页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置

(57)摘要

本发明公开了一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置,该方法包括:于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养;取不同浓度的钙离子和镁离子培养的蓝藻培养液,收集藻细胞,进而检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数;取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集上清液,检测其中微囊藻毒素的含量;对上述两步骤的结果进行相关性分析,建立不同浓度钙离子和镁离子培养的蓝藻中藻毒素产生量与mcyD的基因拷贝数的关系;利用藻毒素产生量与mcyD的基因拷贝数的关系,通过测定mcyD的基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。



1. 一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,包括如下步骤:

步骤一,于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养;

步骤二,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集藻细胞,进而检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数;

步骤三,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集上清液,检测其中微囊藻毒素的含量;

步骤四,对步骤二和步骤三的结果进行相关性分析,建立不同浓度钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻中藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系;

步骤五,利用藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系,通过测定微囊藻毒素产毒基因mcyD的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. 如权利要求1所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于,步骤二进一步包括:

步骤S1,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的铜绿微囊藻培养液,去掉上清液,收集藻细胞;

步骤S2,将藻细胞转移至离心管中,洗涤后再次离心并去掉上清液,收集藻细胞;

步骤S3,对步骤S2中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取;

步骤S4,进行RNA的反转录,合成cDNA;

步骤S5,以步骤S4中的cDNA为模板进行PCR扩增;

步骤S6,对PCR扩增产物进行纯化;

步骤S7,将纯化后的DNA进行质粒转化过程,获得转化了质粒的白色菌落;

步骤S8,利用步骤S7中的白色菌落提取质粒,测定质粒浓度后,进行梯度稀释,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;

步骤S9,将步骤S4中获得的cDNA样品作为待测样品替代步骤S8中的标准样品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定待测样品中的DNA浓度,并检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数。

3. 如权利要求2所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于:于步骤S1中,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的 m_1 毫升铜绿微囊藻培养液,采用低温离心,去掉上清液。

4. 如权利要求2所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于:于步骤S2中,利用磷酸缓冲盐溶液将藻细胞转移至 m_2 毫升离心管中,采用低温离心去掉上清液,收集藻细胞,并将藻细胞进行低温或液氮保存,用于后续操作。

5. 如权利要求4所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于:于步骤S3中,利用RNA提取试剂盒对步骤S2中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取。

6. 如权利要求5所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,其特征在于:于步骤S5中,以cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50 μ L,引物信息如下:上游引物序列为SEQ IDNO.1、下游引物序列为SEQ IDNO.2,反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性5分钟,随后94 $^{\circ}$ C 30秒,退火温度60 $^{\circ}$ C 40秒和72 $^{\circ}$ C延伸40秒,进行30个循环,最终72 $^{\circ}$ C延伸10分钟,通过

1.5% (wt/vol) 的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

7. 如权利要求6所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法, 其特征在于: 于步骤S9中, 加入实时定量PCR所需试剂, 反应体系为20 μ L, 2 μ L DNA样品, 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 $^{\circ}$ C 30秒; PCR反应, 40个循环, 95 $^{\circ}$ C 5秒, 60 $^{\circ}$ C 30秒。

8. 如权利要求2所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法, 其特征在于, 步骤三进一步包括:

取 m_3 毫升藻细胞培养液, 进行低温离心, 收集上清液, 用于测定培养液中微囊藻毒素含量;

用磷酸缓冲盐缓冲液将藻细胞转移至 m_2 毫升离心管中, 进行低温离心, 洗涤一次;

利用磷酸缓冲盐缓冲液悬浮沉淀的藻细胞, 液氮反复冻融若干次, 进行低温离心, 收集上清液, 用于测定铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素含量;

将获得的每个样品设置三个平行样, 按照酶联免疫试剂盒操作说明测定培养液中微囊藻毒素含量和铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素含量。

9. 如权利要求8所述的一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法, 其特征在于: 在测定微囊藻毒素含量前, 进行预实验, 以确定样品的稀释倍数, 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的微囊藻毒素含量。

10. 一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的装置, 包括:

培养液培养单元, 于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养;

mcyD拷贝数检测单元, 用于取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液, 收集藻细胞, 进而检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数;

藻毒素含量检测单元, 用于取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液, 收集上清液, 检测其中微囊藻毒素的含量;

相关性分析单元, 对所述mcyD拷贝数检测单元和藻毒素含量检测单元的结果进行相关性分析, 建立不同浓度钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻中藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系;

藻毒素生成量确定单元, 利用藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系, 通过测定微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。

检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置,特别是涉及一种藻毒素产毒基因检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置。

背景技术

[0002] 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(microcystin,MC),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。MC影响浮游植物、无脊椎动物和脊椎动物的生长。MC可以导致水体中细菌、原生动物和其他浮游植物(包括硅藻和绿藻)中毒,抑制它们生长繁殖,改变食物链结构,使得铜绿微囊藻成为优势藻种。MC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。

[0003] Am é等研究San Roque水库中蓝藻水华的发生情况,检测了水体中28个物理化学指标,通过对它们进行差异分析,发现温度、碳酸盐、氨氮、硝态氮和镁等是最重要的参数,通过这些参数可以分辨出蓝藻群体含有MC的高低。有研究发现,当钙离子浓度低于20mg/L时,藻细胞以单个形式存在,但是当钙离子浓度高于20mg/L时,藻细胞以群体形式存在。群体形成增加,一方面有效阻止了浮游动物的摄食,提高了微囊藻群体的存活率,另一方面有助于微囊藻的垂直迁移,以便获得更充足的光照和营养。细胞外脂多糖影响微囊藻细胞粘性,有助于一些藻细胞的聚集。目前为止,很少有人研究钙离子和镁离子对铜绿微囊藻生长和藻毒素分泌产生的影响,因此,很有必要提出一种技术手段,以研究钙离子和镁离子对铜绿微囊藻生长和藻毒素分泌产生的影响。

[0004] MC由微囊藻毒素基因簇(microcystin synthetase gene clusters,mcy)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。其中mcyD基因参与编码合成MC的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,因而,本发明提出利用藻毒素合成酶基因研究钙离子和镁离子对藻毒素生成产生的影响。

发明内容

[0005] 为克服上述现有技术存在的不足,本发明之目的在于提供一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置,以通过往培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子,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拷贝数来研究钙离子、镁离子对藻毒素生成产生影响的方法,大大简化藻毒素的测定过程,节省大量的人力和时间。

[0006] 为达上述及其它目的,本发明提出一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,包括如下步骤:

[0007] 步骤一,于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培

养;

[0008] 步骤二,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集藻细胞,进而检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数;

[0009] 步骤三,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集上清液,检测其中微囊藻毒素的含量;

[0010] 步骤四,对步骤二和步骤三的结果进行相关性分析,建立不同浓度钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻中藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系;

[0011] 步骤五,利用藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系,通过测定微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。

[0012] 进一步地,步骤二包括:

[0013] 步骤S1,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的铜绿微囊藻培养液,去掉上清液,收集藻细胞;

[0014] 步骤S2,将藻细胞转移至离心管中,洗涤后再次离心并去掉上清液,收集藻细胞;

[0015] 步骤S3,对步骤S2中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取;

[0016] 步骤S4,进行RNA的反转录,合成cDNA;

[0017] 步骤S5,以步骤S4中的cDNA为模板进行PCR扩增;

[0018] 步骤S6,对PCR扩增产物进行纯化;

[0019] 步骤S7,将纯化后的DNA进行质粒转化过程,获得转化了质粒的白色菌落;

[0020] 步骤S8,利用步骤S7中的白色菌落提取质粒,测定质粒浓度后,进行梯度稀释,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;

[0021] 步骤S9,将步骤S4中获得的cDNA样品作为待测样品替代步骤S8中的标准样品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定待测样品中的DNA浓度,并检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数。

[0022] 进一步地,于步骤S1中,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的 m_1 毫升铜绿微囊藻培养液,用 t 转/分钟离心 n 分钟,去掉上清液。

[0023] 进一步地,于步骤S2中,利用磷酸缓冲盐溶液将藻细胞转移至 m_2 毫升离心管中,采用低温离心去掉上清液,收集藻细胞,并将藻细胞进行低温或液氮保存,用于后续操作。

[0024] 进一步地,于步骤S3中,利用RNA提取试剂盒对步骤S2中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取。

[0025] 进一步地,于步骤S5中,以cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50 μ L,引物信息如下:上游引物序列为5'-GCCCACAAAACCCCAACTC-3' (SEQ IDNO.1)、下游引物序列为5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCTCT-3' (SEQ IDNO.2),反应程序为:95 $^{\circ}$ C预变性5分钟,随后94 $^{\circ}$ C 30秒,退火温度60 $^{\circ}$ C 40秒和72 $^{\circ}$ C 延伸40秒,进行30个循环,最终72 $^{\circ}$ C 延伸10分钟,通过1.5% (wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0026] 进一步地,于步骤S9中,加入实时定量PCR所需试剂,反应体系为20 μ L,2 μ L DNA样品,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 $^{\circ}$ C 30

秒;PCR反应,40个循环,95℃5秒,60℃30秒。

[0027] 进一步地,步骤三包括:

[0028] 取 m_3 毫升藻细胞培养液,进行低温离心,收集上清液,用于测定培养液中微囊藻毒素含量;

[0029] 用磷酸缓冲盐缓冲液将藻细胞转移至 m_2 毫升离心管中,进行低温离心,洗涤一次;

[0030] 利用磷酸缓冲盐缓冲液悬浮沉淀的藻细胞,液氮反复冻融若干次,进行低温离心,收集上清液,用于测定铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素含量;

[0031] 将获得的每个样品设置三个平行样,按照酶联免疫试剂盒操作说明测定培养液中微囊藻毒素含量和铜绿微囊藻细胞内微囊藻毒素含量。

[0032] 进一步地,在测定微囊藻毒素含量前,进行预实验,以确定样品的稀释倍数,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的微囊藻毒素含量。

[0033] 为达到上述目的,本发明还提供一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的装置,包括:

[0034] 培养液培养单元,于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养;

[0035] mcyD拷贝数检测单元,用于取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集藻细胞,进而检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数;

[0036] 藻毒素含量检测单元,用于取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集上清液,检测其中微囊藻毒素的含量;

[0037] 相关性分析单元,对所述mcyD拷贝数检测单元和藻毒素含量检测单元的结果进行相关性分析,建立不同浓度钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻中藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系;

[0038] 藻毒素生成量确定单元,利用藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数的关系,通过测定微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。

[0039] 与现有技术相比,本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置通过于培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子,检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数,建立不同浓度的钙离子或镁离子、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,最终通过检测基因拷贝数来研究微囊藻毒素的含量,实现了一种通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究钙离子、镁离子对微囊藻毒素生成产生影响的方法,简化了微囊藻毒素的测定过程。

附图说明

[0040] 图1为本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法的步骤流程图;

[0041] 图2为本发明具体实施例中步骤102的细部流程图;

[0042] 图3为本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的装置的系统架构

图;

[0043] 图4为本发明具体实施例中mcyD拷贝数检测单元的细部结构图。

具体实施方式

[0044] 以下通过特定的具体实例并结合附图说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭示的内容轻易地了解本发明的其它优点与功效。本发明亦可通过其它不同的具体实例加以施行或应用,本说明书中的各项细节亦可基于不同观点与应用,在不背离本发明的精神下进行各种修饰与变更。

[0045] 图1为本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法的步骤流程图。如图1所示,本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法,包括如下步骤:

[0046] 步骤101,于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养。在本发明具体实施例中,于铜绿微囊藻培养液加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养。

[0047] 步骤102,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集藻细胞,进而检测出待测样本中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数。

[0048] 具体地,如图2所示,步骤102进一步包括:

[0049] 步骤S1,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,去掉上清液。在本发明具体实施例中,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的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,通过离心,藻细胞变为沉淀,将上清液去掉,获得藻细胞。

[0050] 步骤S2,将藻细胞转移至离心管中,用磷酸盐缓冲溶液进行洗涤(即将获得的藻细胞沉淀重新悬起),再次离心,去掉上清液,收集藻细胞。具体地,利用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,于10000转,4℃离心10分钟,去掉上清液,收集藻细胞,并将藻细胞放于-80℃冰箱或液氮保存,用于后续操作。

[0051] 步骤S3,对步骤S2中的藻细胞进行细胞内总RNA(Ribonucleic Acid,糖核酸)的提取。在本发明具体实施例中,利用RNA提取试剂盒对步骤S2中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取。

[0052] 步骤S4,进行RNA的反转录,合成cDNA。在本发明具体实施例中,应用专用于实时定量PCR(Polymerase Chain Reaction,聚合酶链式反应)的反转录试剂盒,进行RNA的反转录,合成cDNA;

[0053] 步骤S5,以步骤S4中的cDNA为模板进行PCR扩增。具体地,以步骤S3中的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50μL(TakaRa Ex Taq HS 0.25μL,10×Ex Taq Buffer 5μL,dNTP Mixture 4μL,cDNA模板4μL,上、下游引物各1μL,其余用灭菌蒸馏水补齐)。引物信息如下:上游引物序列为5'-GCCCACAAAACCCCAACTC-3'(SEQ IDNO.1)、下游引物序列为5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCCTCT-3'(SEQ IDNO.2)。反应程序为:95℃预变性5分钟,随后94℃30秒,退火温度60℃40秒和72℃延伸40秒,进行30个循环,最终72℃延伸10分钟,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0054] 步骤S6,对PCR扩增产物进行纯化:利用DNA胶回收试剂盒(例如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。

[0055] 步骤S7,将纯化后的DNA进行质粒转化过程,获得转化了质粒的白色菌落。具体地,将步骤S6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。

[0056] 步骤S8,利用步骤S7中的白色菌落提取质粒,测定质粒浓度后,进行梯度稀释,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;

[0057] 步骤S9,将步骤S4中获得的cDNA样品作为待测样品替代步骤S8中的标准样品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定待测样品中的DNA浓度,并检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数。具体地,加入实时定量PCR所需试剂(按照SYBR[®]Premix Ex Taq[™]试剂盒说明进行操作),反应体系为20 μ L,2 μ L DNA样品。进行实时定量PCR反应(例如应用ABI公司的Stepone plus Detection System),采用两步法进行PCR扩增,反应条件为:预变性,1个循环,95 $^{\circ}$ C 30秒;PCR反应,40个循环,95 $^{\circ}$ C 5秒,60 $^{\circ}$ C 30秒。

[0058] 步骤103,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集上清液,检测其中微囊藻毒素的含量。

[0059] 在本发明具体实施例中,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。具体地,步骤103进一步包括如下步骤:

[0060] 取50毫升藻细胞培养液(即不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液),10000转,4 $^{\circ}$ C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;

[0061] 用PBS缓冲液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,10000转,4 $^{\circ}$ C离心10分钟,洗涤一次;

[0062] 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 $^{\circ}$ C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;

[0063] 每个样品(即50ml藻细胞培养液通过上述步骤形成的样品)设置三个平行样品,按照酶联免疫试剂盒(ELISA试剂盒)操作说明测定Extra MC和Intra MC含量。较佳地,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。

[0064] 步骤104,对步骤102和步骤103的结果进行相关性分析,建立不同浓度钙离子和镁离子培养的铜绿微囊藻中藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD基因拷贝数的关系。

[0065] 步骤105,利用上述藻毒素产生量与微囊藻毒素产毒基因mcyD基因拷贝数的关系,通过测定微囊藻毒素产毒基因mcyD基因拷贝数来确定不同培养条件下藻毒素的生成量。

[0066] 可见,本发明利用不同浓度的钙离子和镁离子作用铜绿微囊藻,然后将钙离子和镁离子对微囊藻毒素含量与微囊藻毒素产毒基因mcyD拷贝数相关联,建立了钙离子和镁离子浓度、藻毒素含量以及微囊藻毒素产毒基因mcyD之间的相关性。建立相关性之后,可以通

过测定微囊藻毒素产毒基因mcyD拷贝数快速检测钙离子、镁离子对微囊藻产生藻毒素的影响。可以大大简化藻毒素的测定过程,节省大量的人力和时间。

[0067] 图3为本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的装置的系统架构图。如图3所示,本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的装置,包括:培养液培养单元301、mcyD拷贝数检测单元302、藻毒素含量检测单元303、相关性分析单元304以及藻毒素生成量确定单元305。

[0068] 培养液培养单元301,用于往产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子,获得不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,在本发明具体实施例中,培养液培养单元301,往铜绿微囊藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子,获得不同浓度的钙离子和镁离子培养的铜绿微囊藻培养液。

[0069] mcyD拷贝数检测单元302,用于取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集藻细胞,进而检测出待测样本中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数。

[0070] 具体地,如图4所示,mcyD拷贝数检测单元302进一步包括:

[0071] 培养液获取单元3021,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,去掉上清液。在本发明具体实施例中,取不同浓度的钙离子和镁离子培养的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,通过离心,藻细胞变为沉淀,将上清液去掉,获得藻细胞。。

[0072] 藻细胞收集单元3022,用于将藻细胞转移至离心管中,用磷酸盐缓冲溶液进行洗涤(即将获得的藻细胞沉淀重新悬起),再次离心去掉上清液,以收集藻细胞。具体地,利用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,于10000转,4℃离心10分钟,去掉上清液,收集藻细胞,并将藻细胞放于-80℃冰箱或液氮保存,以用于后续操作。

[0073] 总RNA提取单元3023,对藻细胞收集单元3022中的藻细胞进行细胞内总RNA(Ribonucleic Acid,糖核酸)的提取。在本发明具体实施例中,利用RNA提取试剂盒对藻细胞收集单元3022中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取。

[0074] 反转录单元3024,用于进行RNA的反转录,合成cDNA。在本发明具体实施例中,应用专用于实时定量PCR(Polymerase Chain Reaction,聚合酶链式反应)的反转录试剂盒,进行RNA的反转录,合成cDNA;

[0075] PCR扩增单元3025,以反转录单元3024中的cDNA为模板进行PCR扩增。具体地,以反转录单元3024中的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50μL(TakaRa Ex Taq HS 0.25μL, 10×Ex Taq Buffer 5μL,dNTP Mixture 4μL,cDNA模板4μ,上、下游引物各1μL,其余用灭菌蒸馏水补齐)。引物信息如下:上游引物序列为5'-GCCACAAAACCCCAACTC-3'(SEQ IDNO.1)、下游引物序列为5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCTCT-3'(SEQ IDNO.2)。反应程序为:95℃预变性5分钟,随后94℃30秒,退火温度60℃40秒和72℃延伸40秒,进行30个循环,最终72℃延伸10分钟,通过1.5%(wt/vol)的琼脂糖凝胶电泳确认产物。

[0076] 纯化单元3026,用于对PCR扩增产物进行纯化:利用DNA胶回收试剂盒(例如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。

[0077] 质粒转化单元3027,用于将纯化后的DNA进行质粒转化过程,获得转化了质粒的白色菌落。具体地,将步骤106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。

[0078] 标准曲线建立单元3028,利用质粒转化单元3027中的白色菌落提取质粒,测定质粒浓度后,进行梯度稀释,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;

[0079] 定量PCR测定单元3029,用于将反转录单元3024获得的cDNA样品作为利用待测样品替代标准曲线建立单元3028中的标准样品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定待测样品中的DNA浓度,并检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的拷贝数。具体地,加入实时定量PCR所需试剂(按照SYBR[®]Premix Ex Taq[™]试剂盒说明进行操作),反应体系为20 μ L,2 μ L DNA样品。进行实时定量PCR反应(例如应用ABI公司的Stepone plus Detection System),采用两步法进行PCR扩增,反应条件为:预变性,1个循环,95 $^{\circ}$ C 30秒;PCR反应,40个循环,95 $^{\circ}$ C 5秒,60 $^{\circ}$ C 30秒。

[0080] 藻毒素含量检测单元303,用于选取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液,收集上清液,检测其中微囊藻毒素的含量。

[0081] 在本发明具体实施例中,藻毒素含量检测单元303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。具体地,藻毒素含量检测单元303具体通过如下步骤实现:

[0082] 取50毫升藻细胞培养液,10000转,4 $^{\circ}$ C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;

[0083] 用PBS缓冲液将藻细胞转移至1.5毫升离心管中,10000转,4 $^{\circ}$ C离心10分钟,洗涤一次;

[0084] 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 $^{\circ}$ C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;

[0085] 每个样品设置三个平行样,按照酶联免疫试剂盒(ELISA试剂盒)操作说明测定Extra MC和Intra MC含量。较佳地,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。

[0086] 相关性分析单元304,用于对mcyD拷贝数检测单元302和藻毒素含量检测单元303的结果进行相关性分析,建立不同浓度钙离子和镁离子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。

[0087] 藻毒素生成量确定单元305,用于利用上述藻毒素产生量与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。

[0088] 以下将通过几个具体实施例来进一步说明本发明:

[0089] 实施例1:

[0090] 步骤1)不同浓度的钙离子培养的铜绿微囊藻,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 μ 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。

[0091] 步骤2) 用不同浓度的钙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10分钟,去掉上清液;

[0092] 步骤3) 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,于10000转,4℃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;

[0093] 步骤4) 利用RNA提取试剂盒对步骤3)中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取;

[0094] 步骤5) 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;

[0095] 步骤6) 以步骤5)中的cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系为50μL(TakaRa Ex Taq HS 0.25μL,10×Ex Taq Buffer 5μL,dNTP Mixture 4μL,cDNA模板4μL,上、下游引物各1μL,其余用灭菌蒸馏水补齐)。引物信息如下:上游引物序列为5'-GCCCACAAAACCCCACTC-3'(SEQ IDNO.1)、下游引物序列为5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCCTCT-3'(SEQ IDNO.2)。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;

[0096] 步骤7) 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;

[0097] 步骤8) 质粒转化过程:将步骤7)中纯化后的DNA插入质粒载体pMD18-T中,并进一步转化到DH5α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;

[0098] 步骤9) 利用步骤8)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;

[0099] 步骤10) 用待测样品替代步骤9)中的标准样品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定待测样品中的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20μL,2μLDNA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。以循环数为横坐标,ΔRn的Log值为纵坐标画图,得到实时定量PCR的扩增曲线,经过数据分析发现,如下表1:

[0100] 表1钙离子作用下微囊藻细胞内mcyD基因的扩增曲线变化

[0101]

循环数	钙离子作用下样品的 ΔR_n											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-0.063500	-0.047020	-1.024592	-0.063802	-0.057888	-0.464255	-0.053548	-0.049211	-1.579396	-0.056991	-0.038204	-0.132113
2	-0.017532	-0.014845	-0.674473	-0.021501	-0.018375	-0.276682	-0.020939	-0.013358	-1.039156	-0.020563	-0.010471	-0.099062
3	-0.000440	-0.002455	-0.306038	0.002303	0.003102	-0.142314	0.001181	0.001290	-0.493646	-0.004889	0.007653	-0.079503
4	-0.002010	0.001001	-0.086836	0.001627	0.000720	-0.078828	0.001521	-0.001432	-0.090803	0.004745	0.001464	-0.045876
5	0.001695	0.000562	-0.026990	-0.000457	0.000325	-0.016367	-0.001758	-0.000865	0.060119	0.002574	0.000602	-0.015659
6	-0.001356	-0.002511	0.008666	-0.001009	0.000526	0.016208	0.000207	0.001906	0.086968	-0.001735	-0.004194	-0.001878
7	-0.000219	-0.000916	0.062344	-0.000989	-0.000243	0.041765	0.001623	0.000754	0.107039	-0.001500	-0.003909	0.027412
8	0.001634	0.002492	0.081297	-0.000623	0.000309	0.063765	0.000028	-0.001846	0.111002	0.002750	-0.002460	0.042128
9	0.000405	-0.001213	0.097054	-0.000393	0.000912	0.059620	-0.000144	0.001784	0.141151	-0.000838	-0.002656	0.037210
10	-0.002730	0.001278	0.110912	0.002400	0.002014	0.083568	0.001521	0.000856	0.157425	-0.003131	-0.002000	0.030562
11	0.000392	0.002805	0.101849	0.000638	-0.002875	0.066229	0.001103	0.000403	0.107101	-0.000554	0.000066	0.033006
12	0.003146	0.002844	0.078402	-0.004899	-0.000162	0.044895	-0.002673	0.000416	0.085119	0.000548	0.001690	0.027827
13	0.003135	0.002757	0.069753	-0.001199	-0.001268	0.034044	-0.003836	0.000405	0.052913	0.002286	0.002265	0.018152
14	0.003475	0.000585	0.043576	-0.000317	-0.004565	0.010294	-0.000657	-0.000579	0.020380	0.001581	-0.000629	0.020123
15	-0.003898	-0.002641	0.048449	0.000106	-0.004562	0.007352	-0.001168	-0.004361	0.003692	-0.000603	0.000425	0.006421
16	0.000389	-0.002681	0.041643	-0.001779	-0.004969	-0.020291	-0.000620	-0.001763	0.023902	0.001350	-0.000295	0.003725
17	-0.002332	-0.001131	0.003370	0.000654	0.000332	-0.041104	-0.001704	-0.001162	-0.038862	-0.001437	-0.000495	-0.007770
18	-0.005099	-0.002451	-0.024417	0.000889	-0.002382	-0.059178	-0.000567	-0.000490	-0.075792	-0.001097	0.000196	-0.013903
19	0.002904	0.000064	-0.044701	0.003047	0.002676	-0.069657	0.000817	-0.001551	-0.108360	-0.000862	-0.000326	-0.023721
20	0.000908	-0.001994	-0.068497	0.011020	0.010110	-0.084077	0.005126	0.006236	-0.149346	0.000812	0.002603	-0.027993
21	0.001092	0.003608	-0.085820	0.025983	0.016527	-0.091434	0.010189	0.008487	-0.177504	0.004627	0.002321	-0.030264
22	0.014497	0.009334	-0.104013	0.054952	0.042051	-0.091947	0.024902	0.022496	-0.196384	0.016754	0.012688	-0.028749
23	0.028598	0.019477	-0.128120	0.112636	0.089860	-0.074387	0.052832	0.060369	-0.200823	0.034743	0.028790	-0.022319
24	0.068722	0.041468	-0.127650	0.225480	0.178195	-0.019340	0.109250	0.124845	-0.173669	0.077442	0.061973	0.000360
25	0.147582	0.086891	-0.136429	0.443089	0.358772	0.127245	0.218890	0.251498	-0.092430	0.160131	0.132331	0.048538
26	0.298680	0.174000	-0.107859	0.855059	0.694705	0.371924	0.431769	0.493390	0.094601	0.319294	0.269840	0.149978
27	0.586977	0.346604	-0.048839	1.584304	1.306095	0.856504	0.831065	0.947601	0.503051	0.628150	0.531208	0.353061
28	1.118284	0.671034	0.082279	2.755524	2.318466	1.700546	1.542168	1.739999	1.204283	1.185949	1.017357	0.736263
29	2.013325	1.258743	0.353282	4.317767	3.766376	2.955331	2.689480	2.971464	2.338291	2.140285	1.857178	1.419242
30	3.368882	2.244429	0.864458	5.840148	5.356326	4.374599	4.256046	4.563968	3.753269	3.545997	3.149245	2.507351
31	4.962908	3.666679	1.746944	6.809169	6.505534	5.343176	5.812769	6.016020	4.822188	5.196572	4.766450	3.957605
32	6.238405	5.257220	3.063178	7.383929	7.110767	5.890326	6.834250	6.861785	5.440978	6.486894	6.179904	5.306507
33	6.893167	6.375818	4.510714	7.965644	7.652909	6.303658	7.362982	7.358991	5.820598	7.166374	6.957304	6.076204
34	7.444467	6.936540	5.481521	8.401412	8.134628	6.645353	7.940483	7.889148	6.122507	7.713712	7.472400	6.586896
35	7.952842	7.510775	6.011508	8.709480	8.487917	6.881952	8.442749	8.282959	6.362562	8.221745	7.996883	7.073550
36	8.321945	7.976267	6.437142	8.938374	8.734365	7.045643	8.748591	8.543023	6.551573	8.575184	8.352650	7.421254
37	8.594128	8.292133	6.780053	9.155773	8.922584	7.184220	8.952147	8.753794	6.646325	8.831059	8.628164	7.658731
38	8.820312	8.520978	7.020553	9.315481	9.084860	7.249422	9.140326	8.933790	6.706853	9.037796	8.816425	7.841879
39	8.965624	8.690398	7.169836	9.427290	9.220187	7.321797	9.292409	9.043423	6.788173	9.180721	8.996784	7.970365
40	9.094214	8.820588	7.327085	9.538485	9.320486	7.361302	9.401042	9.157313	6.828104	9.307254	9.092586	8.096823

[0102] 可见, mcyD 基因的指数扩增期和平台期都十分明显, 荧光定量动力学曲线平滑, 为理想的扩增曲线, 说明本发明的 PCR 方法是成功的, 可用于 mcyD 基因的定量分析。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 值一致 (80.98°C)。标准曲线相关系数为 0.9993, 根据标准曲线确定样品中 mcyD 基因的拷贝数;

[0103] 步骤 11) 微囊藻毒素的检测

[0104] 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°C 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;

[0105] 步骤12)对步骤10)和步骤11)的结果进行相关性分析。结果表明,不同浓度的钙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0.9865,b为-31.375。

[0106] 实施例2:

[0107] 步骤1)不同浓度的镁离子培养的铜绿微囊藻,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。

[0108] 步骤2)用不同浓度的镁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10分钟,去掉上清液;

[0109] 步骤3)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,于10000转,4℃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;

[0110] 步骤4)利用RNA提取试剂盒对步骤3)中的藻细胞进行细胞内总RNA的提取;

[0111] 步骤5)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;

[0112] 步骤6)以步骤5)中的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:上游引物序列为5'-GCCCACAAAACCCCAACTC-3'(SEQ IDNO.1)、下游引物序列为5'-TTTCTGCCTAATCTTTTCCCCTCT-3'(SEQ IDNO.2)。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;

[0113] 步骤7)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;

[0114] 步骤8)质粒转化过程:将步骤7)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;

[0115] 步骤9)利用步骤8)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;

[0116] 步骤10)用待测样品替代步骤9)中的标准品,进行定量PCR的测定,根据标准曲线确定待测样品中的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。以循环数为横坐标,ΔRn的Log值为纵坐标画图,得到实时定量PCR的扩增曲线,经过数据分析发现,如表2所示:

[0117] 表2镁离子作用下微囊藻细胞内mcyD基因的扩增曲线变化

[0118]

循环数	镁离子作用下样品的 ΔRn											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-0.081913	-0.062057	-0.105957	-0.127034	-0.031271	-0.061284	-0.051152	-0.021132	-0.031133	-0.074964	-0.061779	-0.039310
2	-0.043397	-0.042955	-0.055841	-0.080521	-0.023689	-0.068801	-0.027423	-0.016431	-0.035538	-0.054226	-0.066786	-0.050983
3	-0.009075	-0.022361	-0.024696	-0.029348	-0.009589	-0.041637	-0.003892	0.005604	-0.022717	-0.021460	-0.039325	-0.043768
4	-0.002873	-0.004980	-0.006001	-0.012451	-0.003391	-0.010847	-0.005995	0.002858	-0.018345	-0.005683	-0.013061	-0.028018
5	-0.002130	0.001311	0.003165	-0.002223	-0.001074	0.009626	0.002922	-0.000627	-0.001894	0.004509	0.001798	-0.003681
6	0.000166	0.005211	0.005018	0.004043	0.003119	0.011522	0.001749	-0.003586	0.005184	0.010205	0.009857	0.014379
7	0.001149	0.005351	0.007951	0.008376	0.002477	0.010329	0.000905	-0.005201	0.011960	0.005188	0.013776	0.023775
8	0.004388	0.007892	0.010439	0.009630	0.004457	0.012405	0.001896	-0.006113	0.014226	0.002407	0.017536	0.026479
9	0.004446	0.006783	0.005686	0.010060	0.002959	0.010457	0.002522	-0.003983	0.013619	0.010744	0.014620	0.021913
10	0.007448	0.006994	0.005957	0.014557	0.001581	0.008262	0.004312	-0.001830	0.011401	0.003532	0.011993	0.019748
11	0.001752	0.003816	0.001720	0.009296	0.003687	0.008963	0.000142	0.002948	0.009006	0.004395	0.009227	0.013733
12	0.005375	0.004084	0.005214	0.011004	0.004101	0.007575	0.000429	0.004041	0.006028	-0.000424	0.006722	0.008201
13	0.001433	0.003147	0.002080	0.006593	0.001493	-0.000283	0.000992	0.004917	0.001814	0.005315	0.003503	0.000946
14	-0.001214	0.002279	0.002858	0.002991	0.001928	-0.001309	-0.001301	0.006246	0.000565	-0.001954	-0.001906	-0.005059
15	-0.000012	-0.000059	-0.000592	0.002384	-0.000152	-0.000390	0.000705	0.003869	-0.005367	-0.004914	-0.003016	-0.011895
16	-0.002320	-0.002909	-0.001629	-0.001492	-0.003423	-0.002741	-0.003132	-0.000977	-0.006332	-0.006095	-0.008659	-0.014818
17	-0.001296	-0.005644	-0.004858	-0.008365	-0.003823	-0.002325	-0.001924	-0.008167	-0.009384	-0.005766	-0.011788	-0.021934
18	-0.003338	-0.004562	-0.006109	-0.006606	-0.002067	-0.004593	-0.000328	-0.015826	-0.009765	-0.003532	-0.011275	-0.026248
19	-0.002716	-0.006354	-0.005262	-0.009232	-0.002283	-0.007479	0.005103	-0.019059	-0.010324	0.004028	-0.010269	-0.021656
20	-0.001182	-0.005151	-0.000941	-0.009217	0.002362	-0.007537	0.019344	-0.020118	-0.002971	0.018735	-0.002044	-0.014505
21	0.002303	0.002151	0.002164	-0.013680	0.010943	-0.003401	0.038379	-0.014502	0.010583	0.057772	0.024059	0.012642
22	0.020310	0.013305	0.016065	0.002310	0.026009	0.007947	0.084870	0.016605	0.049310	0.132540	0.074670	0.067425
23	0.049215	0.040062	0.050122	0.028917	0.057542	0.036606	0.181229	0.081725	0.120285	0.282990	0.179705	0.182960
24	0.107657	0.100980	0.110380	0.084266	0.122683	0.081524	0.364180	0.226445	0.261798	0.582326	0.389465	0.411322
25	0.219854	0.215603	0.235534	0.187944	0.250180	0.176874	0.713463	0.506610	0.530351	1.140162	0.789667	0.854420
26	0.447290	0.441449	0.468768	0.410142	0.495116	0.364755	1.341006	1.026713	1.026778	2.154420	1.511817	1.642480
27	0.872320	0.861145	0.917147	0.820595	0.948849	0.725135	2.365846	1.911274	1.860908	3.782848	2.689674	2.916894
28	1.602991	1.600079	1.693286	1.537656	1.736394	1.358147	3.805965	3.205347	3.080556	6.015284	4.296396	4.640904
29	2.737782	2.750024	2.890151	2.657811	2.924288	2.381111	5.343123	4.696434	4.491974	8.183168	5.901591	6.381924
30	4.192612	4.244297	4.412272	4.091957	4.401832	3.766368	6.437465	5.860419	5.626480	9.578507	6.969086	7.502257
31	5.501595	5.640925	5.812305	5.399787	5.682364	5.189768	6.994666	6.443248	6.216242	10.394688	7.541010	8.121579
32	6.248415	6.477483	6.639762	6.146832	6.395453	6.136712	7.480867	6.913754	6.637778	11.258747	8.123908	8.742319
33	6.728006	6.961973	7.116915	6.625990	6.868815	6.621710	7.935912	7.363854	7.033220	11.977525	8.608483	9.255661
34	7.229011	7.460400	7.622721	7.123845	7.344901	7.110220	8.250100	7.687416	7.352532	12.479256	8.958666	9.635236
35	7.604506	7.836214	7.966590	7.500210	7.699424	7.493679	8.494649	7.913818	7.547694	12.858426	9.211826	9.918685
36	7.865778	8.114651	8.241602	7.744845	7.963100	7.778781	8.653248	8.072536	7.703369	13.161514	9.408295	10.143268
37	8.078744	8.334361	8.438501	7.963508	8.152713	7.985528	8.788478	8.203419	7.834638	13.464061	9.550983	10.293366
38	8.213664	8.470032	8.598213	8.102674	8.306515	8.135227	8.904966	8.311531	7.935730	13.629571	9.664825	10.433081
39	8.334361	8.595329	8.698704	8.223586	8.419255	8.247917	9.015635	8.379686	8.001653	13.795915	9.776435	10.560454
40	8.463527	8.706081	8.804458	8.311340	8.524385	8.368611	9.066113	8.444594	8.080276	13.970108	9.858607	10.644126

[0119] 可见,mcyD基因的指数扩增期和平台期都十分明显,荧光定量动力学曲线平滑,为理想的扩增曲线,说明本发明的PCR方法是成功的,可用于mcyD基因的定量分析。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 值一致(81.13℃)。标准曲线相关系数为0.9993,根据标准曲线确定样品中mcyD基因的拷贝数;

[0120] 步骤11) 微囊藻毒素的检测

[0121] 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;

[0122] 步骤12) 对步骤10) 和步骤11) 的结果进行相关性分析。结果表明,不同浓度的镁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1.1014,b为-37.555。

[0123] 可见,本发明一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置通过于培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子,检测微囊藻毒素的含量和微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数,建立不同浓度的钙离子或镁离子、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,最终通过检测基因拷贝数来研究微囊藻毒素的含量,实现了一种通过检测藻毒素合成酶基因mcyD拷贝数来研究钙离子、镁离子对微囊藻毒素生成产生影响的方法,简化了藻毒素的测定过程,本发明特异性强、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。

[0124] 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> 检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置

<130> 2017

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 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

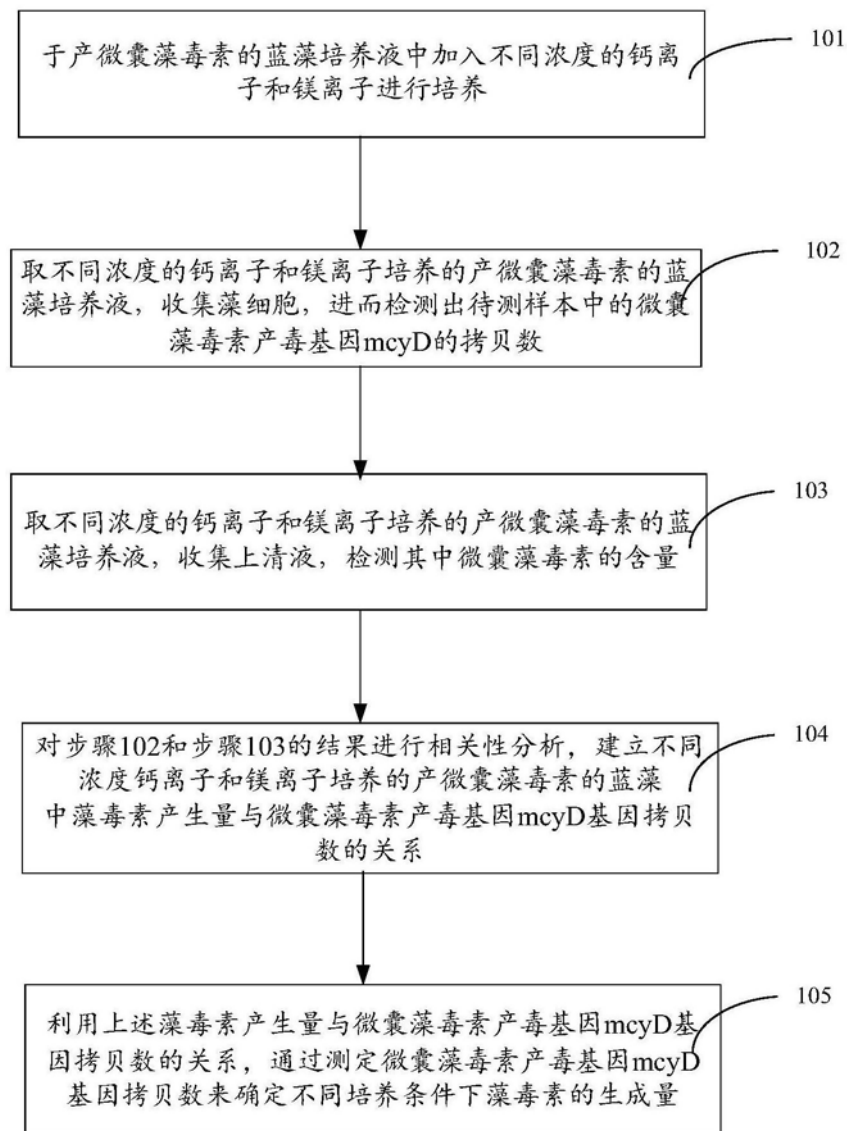


图1

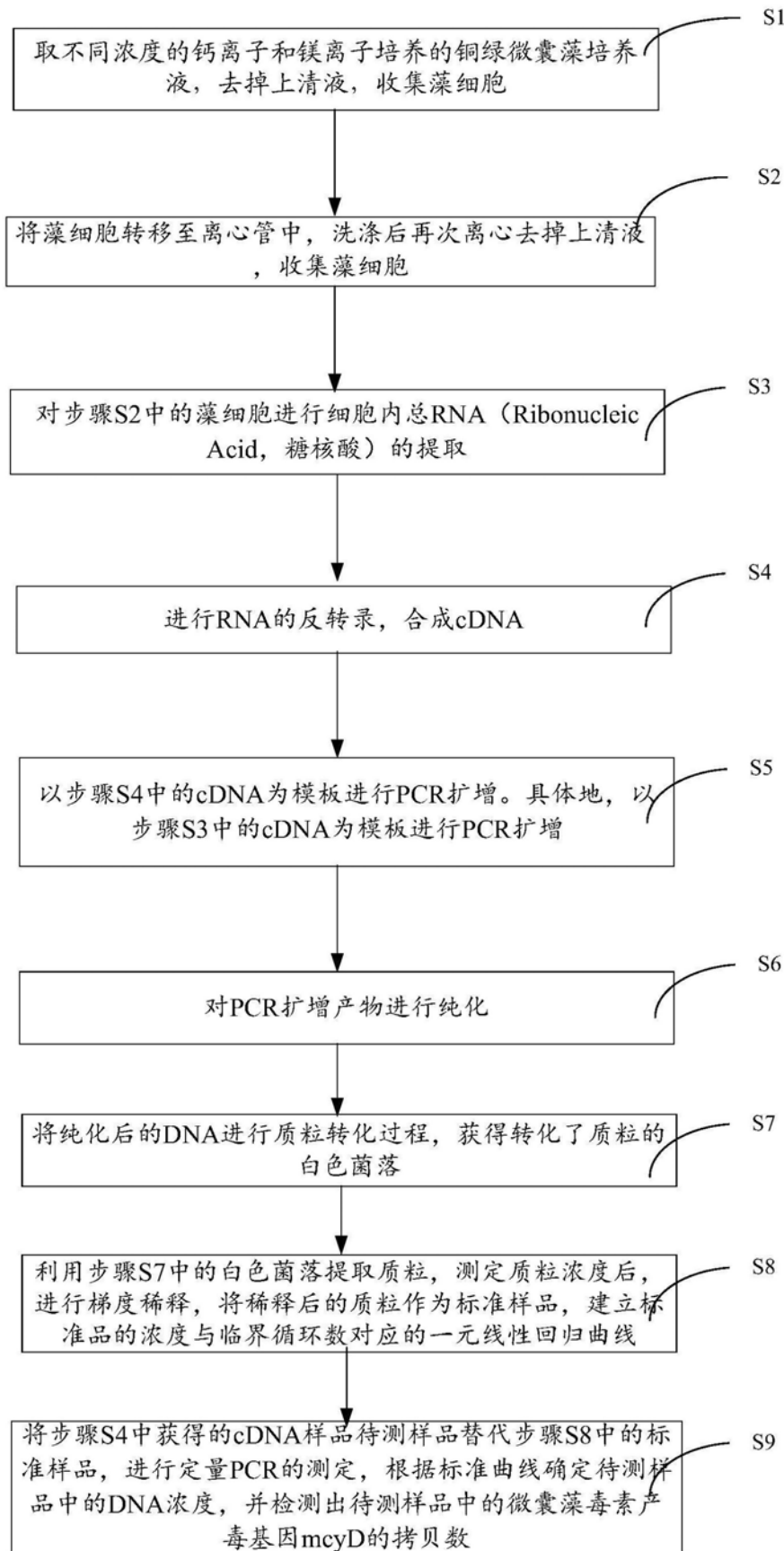


图2

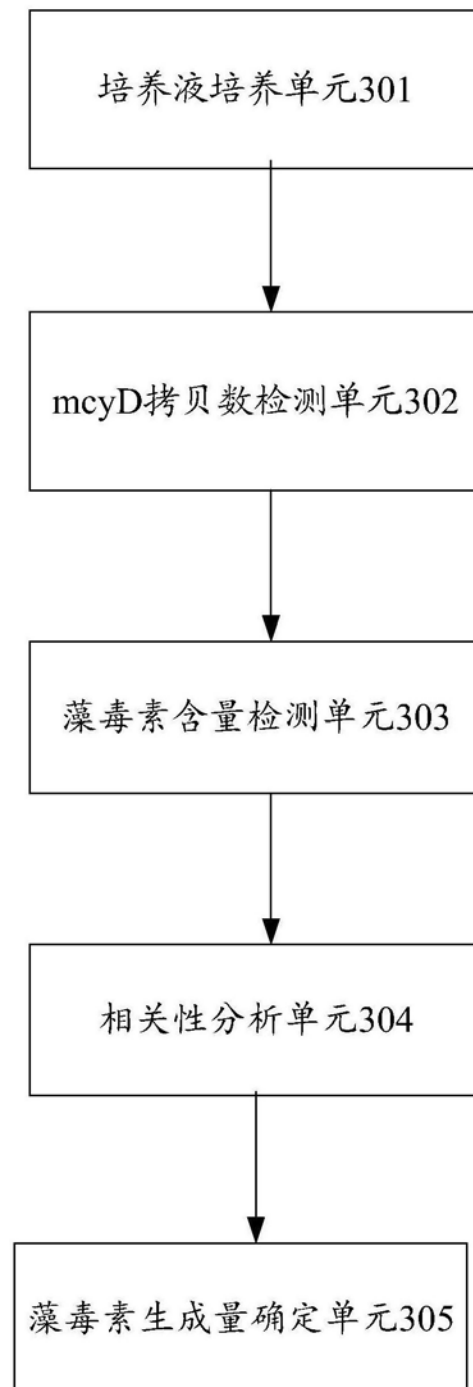


图3

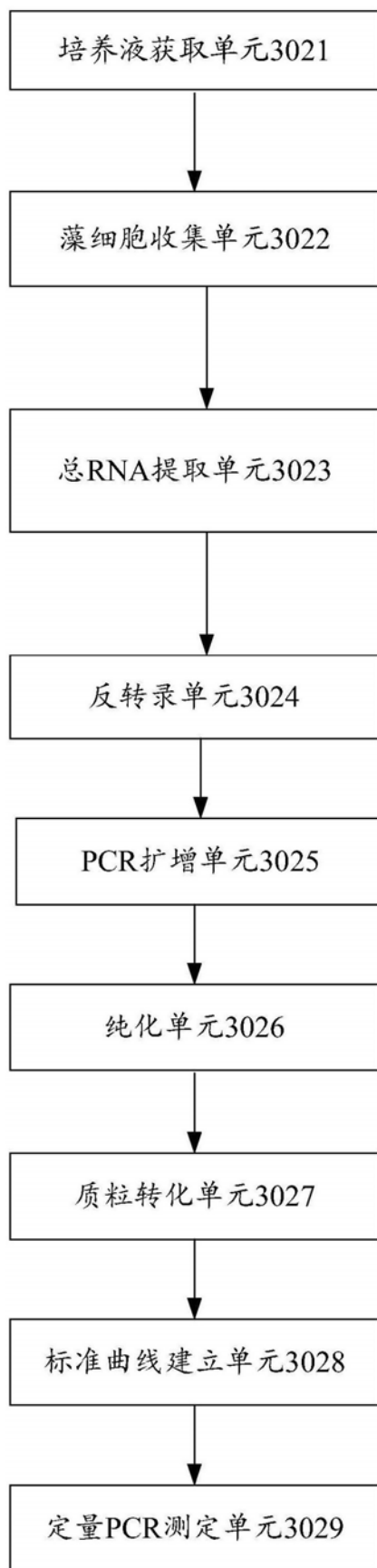


图4

专利名称(译)	检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置		
公开(公告)号	CN107488719A	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN2017110815784.7	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 张东 舒诗湖 王铮 马艳		
发明人	陈蕾 何义亮 姜蕾 张东 舒诗湖 王铮 马艳		
IPC分类号	C12Q1/68 C12M1/34 G01N33/53 G06F19/24		
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)

本发明公开了一种检测钙离子和镁离子对微囊藻毒素生成影响的方法及装置，该方法包括：于产微囊藻毒素的蓝藻培养液中加入不同浓度的钙离子和镁离子进行培养；取不同浓度的钙离子和镁离子培养的蓝藻培养液，收集藻细胞，进而检测出待测样品中的微囊藻毒素产毒基因mcyD的基因拷贝数；取不同浓度的钙离子和镁离子培养的产微囊藻毒素的蓝藻培养液，收集上清液，检测其中微囊藻毒素的含量；对上述两步骤的结果进行相关性分析，建立不同浓度钙离子和镁离子培养的蓝藻中藻毒素产生量与mcyD的基因拷贝数的关系；利用藻毒素产生量与mcyD的基因拷贝数的关系，通过测定mcyD的基因拷贝数来确定不同培养条件下微囊藻毒素的生成量。

