



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105368950 B

(45)授权公告日 2018.09.14

(21)申请号 201510884383.8

审查员 李恩

(22)申请日 2015.12.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105368950 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(73)专利权人 中国科学院水生生物研究所

地址 430072 湖北省武汉市武昌区东湖南路7号

(72)发明人 吴振斌 陈芝兰 刘碧云 周巧红

贺锋 徐栋 田云 王艳云

张甬元

(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 1/6851(2018.01)

权利要求书1页 说明书10页

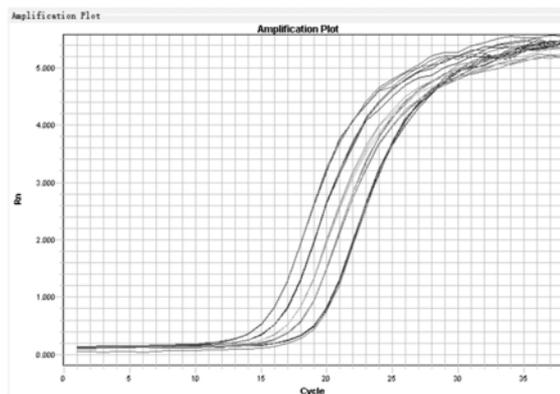
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒及应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒及应用,普通PCR反应液I包含针对聚球藻 *an150* 基因设计的一对特异性引物,普通PCR反应液II包含针对聚球藻 CDS:ABB57481.1 基因设计的一对特异性引物,定量PCR反应液I包含针对聚球藻 *an150* 基因设计的一对特异性引物,定量PCR反应液II中包含针对聚球藻 CDS:ABB57481.1 基因设计的一对特异性引物,其中扩增 *an150* 基因的普通PCR上游引物与该基因的结合位置在其定量PCR上游引物与该基因结合位置的上游, *an150* 基因的普通PCR下游引物与该基因的结合位置在其定量PCR下游引物与该基因结合位置的下游。该试剂盒快速检测蓝藻质粒的拷贝数,具有高灵敏度、特异性、稳定性和重现性。适用于蓝藻质粒DNA的定量检测,对于检测蓝藻细胞的DNA损伤具有实际的应用价值。



1. 一种定量检测蓝藻细胞质粒拷贝数的定量PCR试剂盒,该试剂盒包括普通PCR反应液I、普通PCR反应液II、包含聚球藻an150基因插入序列的标准品I、包含聚球藻的CDS: ABB57481.1基因插入序列的标准品II、空白对照品、包含聚球藻an150基因的定量PCR引物的定量PCR反应液I和包含聚球藻CDS: ABB57481.1基因的定量PCR引物的定量PCR反应液II,其特征在于:普通PCR反应液I包含针对聚球藻an150基因设计的一对特异性引物,普通PCR反应液II包含针对聚球藻CDS: ABB57481.1基因设计的一对特异性引物,定量PCR反应液I包含针对聚球藻an150基因设计的一对特异性引物,定量PCR反应液II中包含针对聚球藻CDS: ABB57481.1基因设计的一对特异性引物,其中扩增an150基因的普通PCR上游引物与该基因的结合位置在其定量PCR上游引物与该基因结合位置的上游,an150基因的普通PCR下游引物与该基因的结合位置在其定量PCR下游引物与该基因结合位置的下游;CDS: ABB57481.1基因的引物设计采用同样方式;

所述的普通PCR反应液I是由扩增聚球藻an150基因的引物对,2×Taq PCR Master Mix和无菌的超纯水组成,聚球藻an150基因的普通PCR正向引物为SEQ ID NO:1,反向引物为SEQ ID NO:2;

所述的普通PCR反应液II是由扩增聚球藻CDS: ABB57481.1基因的PCR的引物对,2×Taq PCR Master Mix和无菌的超纯水组成,聚球藻CDS: ABB57481.1基因的普通PCR正向引物为SEQ ID NO:3,反向引物为SEQ ID NO:4;

所述的定量PCR反应液I是由an150基因定量PCR引物对、2×real time PCR Mix和无菌水组成,an150基因的定量PCR正向引物为SEQ ID NO:5,反向引物为SEQ ID NO:6;

所述的定量PCR反应液II是由聚球藻CDS: ABB57481.1基因定量PCR引物对、2×real time PCR Mix和无菌水组成,聚球藻CDS: ABB57481.1基因的定量PCR正向引物为SEQ ID NO:7,反向引物为SEQ ID NO:8;

所述的标准品I是含有聚球藻an150基因的1401个核苷酸片段,所述的an150基因的标准品I为SEQ ID NO:9,标准品I用Nanodrop进行定量,储存浓度为 10^5 拷贝/ μL 、 10^6 拷贝/ μL 、 10^7 拷贝/ μL 、 10^8 拷贝/ μL 、 10^9 拷贝/ μL 5个浓度梯度;

所述的标准品II是含有聚球藻CDS: ABB57481.1基因的1414个核苷酸片段,所述的CDS: ABB57481.1基因的标准品II为SEQ ID NO:10,标准品II用Nanodrop进行定量,储存浓度为 10^4 拷贝/ μL 、 10^5 拷贝/ μL 、 10^6 拷贝/ μL 、 10^7 拷贝/ μL 、 10^8 拷贝/ μL 5个浓度梯度;

所述的空白对照品为无菌的超纯水。

2. 权利要求1所述的一种定量检测蓝藻细胞质粒拷贝数的定量PCR试剂盒在定量检测蓝藻细胞质粒拷贝数中的应用。

一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学和实验方法领域,特别提供了一种定量检测蓝藻细胞质粒DNA拷贝数的实时荧光定量聚合酶链式反应(Real Time Polymerase Chain Reaction, Real Time PCR)试剂盒,同时还涉及一种定量检测蓝藻质粒的实时荧光定量PCR试剂盒的用途。

背景技术

[0002] 在分子生物学中,实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR)作为一种给未知模板进行定量分析的方法,由于其定量准确、灵敏度高、特异性强和重现性好等优点已经成为一种重要工具,被广泛应用于起始模板的测定、基因型的分析、熔解曲线分析等方面的研究。

[0003] 研究表明,细胞内的质粒拷贝数与细胞的生长过程相关(Carapuça E, Azzoni AR, Prazeres DM, Monteiro GA, Mergulhão FJ. Mol Biotechnol. 2007, 37 (2) :120-126.)。细胞质粒的拷贝数与质粒的存在与和细胞所处的环境和化合物暴露情况密切相关(Pickett MA, Everson JS, Pead PJ, Clarke IN. Microbiology. 2005, 151 (Pt 3) :893-903)。对原核生物细菌中大肠杆菌(*Escherichia coli*)的质粒拷贝数研究的较多,衣原体的不同种(*Chlamydia trachomatis*和*Chlamydia pneumoniae* (N16))的质粒拷贝数也有研究。真核生物中中国仓鼠卵巢细胞(*Chinese hamster ovary* (CHO) cells)也有相关报道。

[0004] 目前尚缺乏对原核生物蓝藻细胞的质粒拷贝数进行定量的方法。对蓝藻质粒拷贝数的定量,可以评价蓝藻细胞的生理状态,可以检测蓝藻细胞对环境胁迫的响应,从而检测环境中的危险因素。

发明内容

[0005] 本发明的目的是在于提供了一种通过定量检测蓝藻细胞质粒的实时定量PCR试剂盒,用于评价蓝藻细胞的生理状态,和蓝藻细胞对环境胁迫的响应。该试剂盒适用于目前存在市场上的所有类型荧光定量基因扩增仪。本发明能够检测蓝藻细胞的质粒拷贝数水平,判断蓝藻细胞正常与否,在蓝藻细胞对环境胁迫方面有良好的应用前景。

[0006] 本发明的另一目的是在于提供了一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒在定量检测蓝藻细胞质粒拷贝数中的应用,上述试剂盒的灵敏度和特异性高,检测方法简便、快速,实验结果可靠。

[0007] 为了实现上述的目的,本发明提供:

[0008] 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒,该试剂盒包括:包含聚球藻(*Synechococcus* sp.) an150基因的引物的普通PCR反应液I {多个公司的2×Taq PCR Master Mix均可,如天根生化的2x PCR Reagent (KT207)}、包含聚球藻(*Synechococcus* sp.) CDS: ABB57481.1基因的引物的普通PCR反应液II {多个公司的2×Taq PCR Master Mix均可,如天根生化的2x PCR Reagent (KT207)}、空白对照品(无菌的超纯水)、包含聚球藻(*Synechococcus* sp.)

an150基因的定量PCR引物的定量PCR反应液I {多个公司的2×real time PCR Mix均可,如Qiagen的QuantiTect Primer Assay (Product no.249900)} 和包含聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因的定量PCR引物的定量PCR反应液II {多个公司的2×real time PCR Mix均可,如Qiagen的QuantiTect Primer Assay (Product no.249900)},其特征在于:普通PCR反应液I包含针对聚球藻 (*Synechococcus* sp.) an150基因设计的一对特异性引物,普通PCR反应液II包含针对聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因设计的一对特异性引物,定量PCR反应液I包含针对聚球藻 (*Synechococcus* sp.) an150基因设计的一对特异性引物,定量PCR反应液II中包含针对聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因设计的一对特异性引物。其中扩增an150基因的普通PCR上游引物与该基因的结合位置在其定量PCR上游引物与该基因结合位置的上游,an150基因的普通PCR下游引物与该基因的结合位置在其定量PCR下游引物与该基因结合位置的下游。对CDS:ABB57481.1基因用同样的方法设计引物。

[0009] 在本发明的一个优选方案中,普通PCR反应液I是由扩增聚球藻 (*Synechococcus* sp.) an150基因的引物对,2x PCR Reagent (KT207,天根生化) 和无菌的超纯水组成。在本发明的一个具体方案中,聚球藻 (*Synechococcus* sp.) an150基因的普通PCR正向引物 (SEQ ID NO:1) 为5' -CGATTCGCCATGCCGAAGAGG-3',反向引物 (SEQ ID NO:2) 为5' -ACTGTCTCGGCAGCAATTT-3'。

[0010] 在本发明的一个优选方案中,普通PCR反应液II是由扩增聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因的PCR的引物对,2x PCR Reagent (KT207,天根生化) 和无菌的超纯水组成。在本发明的一个具体方案中,聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因的普通PCR正向引物 (SEQ ID NO:3) 为5' -CGTCCTACCTGCTCGTTTACA-3',反向引物 (SEQ ID NO:4) 为5' -AGCCCTCGTTAGTCCCAGTA-3'。

[0011] 在本发明的一个优选方案中,定量PCR反应液I是由an150基因定量PCR引物对、QuantiTect Primer Assay (249900,Qiagen) 和无菌水组成。在本发明的一个具体方案中,an150基因的定量PCR正向引物 (SEQ ID NO:5) 为5' -CATCGCTGGCTT ACAACTG-3',反向引物 (SEQ ID NO:6) 为5' -GCTCTGGCTGCTGA TACG-3'。

[0012] 在本发明的一个优选方案中,定量PCR反应液II是由聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因定量PCR引物对、QuantiTect Primer Assay (249900,Qiagen) 和无菌水组成。在本发明的一个具体方案中,聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因的定量PCR正向引物 (SEQ ID NO:7) 为5' -ATCTACGGTCGGTCTACG-3',反向引物 (SEQ ID NO:8) 为5' -TTCCTCAACCTCACCTAAGC-3'。

[0013] 在本发明的一个优选方案中,标准品I是含有聚球藻 (*Synechococcus* sp.) an150基因的1401个核苷酸片段。所述的an150基因的标准品I (SEQ ID NO:9) 见附件序列列表。标准品I用Nanodrop进行定量,储存浓度为 10^5 拷贝/ μ L、 10^6 拷贝/ μ L、 10^7 拷贝/ μ L、 10^8 拷贝/ μ L、 10^9 拷贝/ μ L 5个浓度梯度。

[0014] 在本发明的一个优选方案中,标准品II是含有聚球藻 (*Synechococcus* sp.) CDS:ABB57481.1基因的1414个核苷酸片段。所述的CDS:ABB57481.1基因的标准品II (SEQ ID NO:10) 见附件序列列表。标准品II用Nanodrop进行定量,储存浓度为 10^4 拷贝/ μ L、 10^5 拷贝/ μ L、 10^6 拷贝/ μ L、 10^7 拷贝/ μ L、 10^8 拷贝/ μ L 5个浓度梯度。

[0015] 在本发明的一个优选方案中,空白对照品为无菌的超纯水。

[0016] 试剂盒中的以上组成具有如下的功能和作用:普通PCR反应液I用于扩增an150基因片段,进而用于制备标准品I。普通PCR反应液II用于扩增CDS:ABB57481.1基因片段,进而用于制备标准品II。标准品I和标准品II分别用于制作定量PCR的标准曲线。定量PCR反应液I用于对an150基因进行定量分析。定量PCR反应液II用于对CDS:ABB57481.1基因进行定量分析。

[0017] 在本发明的一个优选方案中,还提供了一种通过定量检测an150基因的拷贝数,一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒在蓝藻细胞质粒的定量检测中的应用,包括下列步骤:

[0018] 1) 用基因组DNA提取试剂盒对蓝藻总DNA进行提取;

[0019] 2) 蓝藻总DNA分别加入普通PCR反应液I和普通PCR反应液II,用PCR检测仪分别对an150基因片段和CDS:ABB57481.1基因片段进行扩增;

[0020] 3) 将PCR产物进行纯化回收,Nanodrop进行浓度测定,按照公式:拷贝数/mL = $(6.02 \times 10^{23} \text{拷贝数/mol}) \times [\text{浓度}(\text{g/mL}) / \text{分子量}(\text{g/mol})]$ 计算出纯化DNA的拷贝数。将标准品I和标准品II按照10倍稀释法进行系列稀释;

[0021] 4) 将标准品I和待测样品加入定量PCR反应液I,用于检测an150基因;将标准品II和待测样品加入定量PCR反应液II,用于检测CDS:ABB57481.1基因。用定量PCR检测仪进行检测;

[0022] 5) 通过比较待测样品和标准品的循环域值,根据标准曲线计算待测样品的起始an150基因和CDS:ABB57481.1基因拷贝数。蓝藻细胞在环境胁迫下,处理组蓝藻细胞的an150基因和CDS:ABB57481.1基因的拷贝数与对照组相比将发生变化(增加或减少)。

[0023] 本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:

[0024] 1) 特异性高。采取蓝藻的特异性引物及相关的PCR反应,对蓝藻特定基因进行了扩增,并由此作为模板进行标准曲线的制定,使得检测的特异性高。

[0025] 2) 检测方法简单,检测速度快。只需将提取的蓝藻细胞DNA作为模板,加入本发明的试剂盒中,按照提供的步骤,可在2小时内得到蓝藻细胞的质粒拷贝数。传统的质粒拷贝数测定方法,如氯化铯-溴化乙锭(CsCl-EB)平衡梯度离心法的测定时间超过24小时,检测过程需要同位素的参与;杂交方法(如Dot-blot和Southern-blot)的准确性较高,检测过程同样需要同位素的参与,检测时间分别为20小时和48小时以上。

[0026] 3) 结果以拷贝数表示,定量结果准确可靠。氯化铯-溴化乙锭(CsCl-EB)平衡梯度离心法准确性较差;虽然通过测定质粒表达的酶活来间接测定质粒拷贝数所需时间短(10分钟),但其准确性差。

[0027] 4) 本发明填补了蓝藻质粒DNA拷贝数检测的空白,不仅可用于评价蓝藻细胞的生理状态,还可检测蓝藻细胞在环境胁迫下的响应。

[0028] 利用本试剂盒检测聚球藻细胞在正常的生理状态下,随着生长时间的延长,质粒拷贝数(以an150基因拷贝数计算)的变化情况。如表1所示。接种第0~6天,随着生长时间的延长,质粒拷贝数增加,接种第6天的质粒拷贝数最大,为 62 ± 22 个/细胞;在随后的3天内,质粒拷贝数降低。

[0029] 表1蓝藻质粒拷贝数与生长期的关系

[0030]

接种天数	质粒拷贝数
0	32±6
1	43±8
2	44±21
3	45±13
4	47±18
5	46±23
6	62±22
7	59±23
8	55±12
9	40±11

[0031] 利用本试剂盒检测H₂O₂暴露情况下的聚球藻细胞内质粒拷贝数水平。从表2中可以发现,不同浓度H₂O₂暴露聚球藻细胞,质粒的拷贝数与对照组相比,发生了变化。具体来说,1~3mM H₂O₂暴露,随着H₂O₂暴露浓度的升高,质粒拷贝数减少,且均低于对照组。4~5mM H₂O₂暴露蓝藻细胞,质粒拷贝数增加,且均高于对照组。

[0032] 表2不同浓度H₂O₂暴露的蓝藻质粒拷贝数水平

[0033]

H ₂ O ₂ 暴露浓度mM	质粒拷贝数
--------------------------------------	-------

[0034]

0	33±7
1	28±5
2	26±7
3	23±5
4	42±8
5	44±7

附图说明

[0035] 图1A为一种标准品I的扩增曲线。

[0036] 图1B为一种标准品I的标准曲线。

[0037] 图2A为一种标准品II的扩增曲线。

[0038] 图2B为一种标准品II的标准曲线。

[0039] 图3为一种正常蓝藻细胞an150基因的绝对定量扩增曲线。

[0040] 图4为一种H₂O₂暴露下蓝藻an150基因的绝对定量扩增曲线。

[0041] 图5为一种空白对照品的扩增曲线。

[0042] 图6为一种正常蓝藻细胞CDS:ABB57481.1基因的绝对定量扩增曲线。

[0043] 图7为一种H₂O₂暴露下蓝藻CDS:ABB57481.1基因的绝对定量扩增曲线。

[0044] 图1A为标准品I的的扩增曲线,图1B为根据该曲线得到的标准曲线。从图1B中可以看出,标准曲线的R²值为0.9998。图2A为标准品II的扩增曲线,图2B为根据该曲线得到的标

准曲线。从图2B中可以看出,标准曲线的 R^2 值为0.9995。标准品I和标准品II符合作为标准品的要求。图3为正常蓝藻细胞an150基因的扩增曲线,所测Ct值在15~25之间,在标准品的线性范围之内,定量结果在 $8 \times 10^7 \sim 9 \times 10^8$ 拷贝/ μL 左右。图4为 H_2O_2 暴露下蓝藻an150基因的绝对定量扩增曲线,与正常的蓝藻细胞相比, H_2O_2 暴露使蓝藻质粒的拷贝数发生变化(明显增加或减少)。图5为空白对照品的扩增曲线,结果无扩增信号。图6为正常蓝藻细胞CDS:ABB57481.1基因的绝对定量扩增曲线,所测样本的Ct值在14~17之间,在标准品的线性范围之内,定量结果为CDS:ABB57481.1基因的拷贝数是 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 拷贝/ μL 左右。图7为 H_2O_2 暴露下蓝藻CDS:ABB57481.1基因的绝对定量扩增曲线, H_2O_2 暴露使蓝藻CDS:ABB57481.1基因的拷贝数发生变化。说明该试剂盒提供的检测方法非常灵敏、可靠。

具体实施方式

[0045] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应当理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明要求保护的的范围,下列实施例中未注明具体实验条件和方法,通常按照常规条件如:Sambrook,J.;Russell,D.W.in Molecular Cloning:A Laboratory Manual.3rd ed.;Cold Spring Harbor Press:Cold Spring Harbor,New York,2001或按照制造厂商所建议的条件。

[0046] 下面结合附图及实施方式对本发明作进一步详细的说明:

[0047] 实施例1:

[0048] 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒的制备方法,其步骤是:

[0049] 1.引物的设计与合成:

[0050] 根据NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查询an150和CDS:ABB57481.1基因序列,利用DNAMAN在an150的基因上设计普通PCR的上下游引物和荧光定量PCR上下游引物,其中an150的普通PCR上游引物与该基因的结合位置在其定量PCR上游引物与该基因结合位置的上游,an150的普通PCR下游引物与该基因的结合位置在其定量PCR下游引物与该基因结合位置的下游。对CDS:ABB57481.1基因用同样的方法设计引物。所选引物对于基因的结合有很好的特异性,有较高的PCR扩增效率。引物委托生工生物工程公司(上海)进行合成,其中引物为HAP纯化。引物序列如表3。

[0051] 表3特异性引物序列

[0052]

SEQ NO.	序列名称	寡核苷酸序列 (5'-3')	序列长度
1	<i>anl50</i> 普通 PCR 正向引物	CGATTCGCCATGCCGAAGAGG	21mer
2	<i>anl50</i> 普通 PCR 反向引物	ACTGTCTCGGCAGCAATTT	19mer
3	CDS: ABB57481.1 普通 PCR 正向引物	CGTCCTACCTGCTCGTTTACA	21mer
4	CDS: ABB57481.1 普通 PCR 反向引物	AGCCCTCGTTAGTCCCAGTA	20mer
5	<i>anl50</i> 定量 PCR 正向引物	CATCGCTGGCTTACAACCTG	19mer
6	<i>anl50</i> 定量 PCR 反向引物	GCTCTGGCTGCTGATACG	19mer
7	CDS: ABB57481.1 定量 PCR 正向引物	ATCTACGGTCGGGTCTACG	19mer
8	CDS: ABB57481.1 定量 PCR 反向引物	TTCCTCAACCTCACCTAAGC	20mer

[0053] 2. 蓝藻总DNA模板的制备:

[0054] 1) 10000g, 离心1分钟获取待测的和对照组的蓝藻细胞样品。

[0055] 2) 按照细菌总DNA提取试剂盒(天根生化)的方法提取。

[0056] 3) Nanodrop测定总DNA浓度。

[0057] 4) 稀释总DNA分别至5ng/ μ L和10ng/ μ L, 备用。

[0058] 3. 普通PCR反应液I组成, 如表4。

[0059] 表4普通PCR反应液I组成

[0060]

配方	浓度或量
2x PCR Reagent	1 \times
<i>anl50</i> 普通PCR引物	500nM
DNA模板	10 μ L
ddH ₂ O	余量
总体积	200 μ L

[0061] 4. 普通PCR反应液II组成, 如表5。

[0062] 表5普通PCR反应液II组成

[0063]

配方	浓度或量
----	------

2x PCR Reagent	1×
CDS:ABB57481.1基因普通PCR引物	500nM
DNA模板	10 μ L
ddH ₂ O	余量
总体积	200 μ L

[0064] 5. 标准品I和标准品II的制备:

[0065] 将an150基因和CDS:ABB57481.1基因经普通PCR特异性引物扩增产物,将其纯化回收,将获得的DNA进行浓度和纯度测定。根据公式:拷贝数/mL = $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数/mol}) \times [\text{浓度 (g/mL)} / \text{分子量 (g/mol)}]$ 计算出纯化DNA的拷贝数,并根据测定的拷贝数进行梯度稀释,获得标准品I的5个浓度梯度:10⁵拷贝/ μ L、10⁶拷贝/ μ L、10⁷拷贝/ μ L、10⁸拷贝/ μ L、10⁹拷贝/ μ L;获得标准品II的5个浓度梯度:10⁴拷贝/ μ L、10⁵拷贝/ μ L、10⁶拷贝/ μ L、10⁷拷贝/ μ L、10⁸拷贝/ μ L。-20 $^{\circ}$ C保存。

[0066] 1) 普通PCR:

[0067] 取步骤2提取的蓝藻总DNA作为模板,按照普通PCR反应液的组成配制成普通PCR反应体系,体系各主要成分如下:

[0068] a) 普通PCR反应液I 190 μ L,总DNA模板10 μ L,总体积200 μ L;

[0069] b) 普通PCR反应液II 190 μ L,总DNA模板10 μ L,总体积200 μ L;

[0070] 普通PCR反应程序如表6:

[0071] 表6普通PCR反应程序

[0072]

步骤	温度	时间	循环数
1	95 $^{\circ}$ C	5 分钟	1
2	95 $^{\circ}$ C	45 秒	30
	59 $^{\circ}$ C	45 秒	
	72 $^{\circ}$ C	70 秒	
3	72 $^{\circ}$ C	5 分钟	1
4	4 $^{\circ}$ C	直至结束	1

[0073] 2) 标准品I和标准品II的纯化回收:

[0074] a) 取步骤1)的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,电泳条件为0.7% (质量比) 琼脂糖胶,电泳缓冲液为1 \times TBE,电压为100V,电泳时间为40分钟。

[0075] b) 利用普通琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根生化)对PCR产物进行纯化回收。

[0076] 3) 标准品I和标准品II的拷贝数计算:

[0077] 按照公式:拷贝数/mL = $(6.02 \times 10^{23} \text{ 拷贝数/mol}) \times [\text{浓度 (g/mL)} / \text{分子量 (g/mol)}]$

计算出纯化DNA的拷贝数。

[0078] 4) 标准品I和标准品II的梯度稀释:

[0079] 根据测定步骤3) 计算的拷贝数对DNA进行梯度稀释, 获得标准品I的5个浓度梯度: 10^5 拷贝/ μL 、 10^6 拷贝/ μL 、 10^7 拷贝/ μL 、 10^8 拷贝/ μL 、 10^9 拷贝/ μL ; 获得标准品II的5个浓度梯度: 10^4 拷贝/ μL 、 10^5 拷贝/ μL 、 10^6 拷贝/ μL 、 10^7 拷贝/ μL 、 10^8 拷贝/ μL 。

[0080] 6. 空白对照品的制备:

[0081] 空白对照品为经过 121°C 高压湿热灭菌15分钟的Milli-Q水。

[0082] 7. 定量PCR反应液I组成, 如表7。

[0083] 表7定量PCR反应液I组成

[0084]

配方	浓度或量
QuantiTect Primer Assay	$1 \times$
an150定量PCR引物	500nM
DNA模板	$1\mu\text{L}$
ddH ₂ O	余量

[0085]

总体积	$20\mu\text{L}$
-----	-----------------

[0086] 8. 定量PCR反应液II组成, 如表8。

[0087] 表8定量PCR反应液II组成

[0088]

配方	浓度或量
QuantiTect Primer Assay	$1 \times$
CDS: ABB57481.1定量PCR引物	500nM
DNA模板	$1\mu\text{L}$
ddH ₂ O	余量
总体积	$20\mu\text{L}$

[0089] 实施例2: 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒在检测蓝藻生理状态中的应用。

[0090] 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒在定量检测生理状态下蓝藻细胞质粒拷贝数中的应用, 其步骤是:

[0091] 1. 定量PCR检测an150基因的拷贝数:

[0092] 1) 按照定量PCR反应液I组成, 配制定量PCR反应体系, 取蓝藻总DNA、标准品I的5个标准品以及空白对照品各 $1\mu\text{L}$, 体系各主要成分如下:

[0093] 定量PCR反应液I $19\mu\text{L}$, DNA模板 $1\mu\text{L}$; 总体积 $20\mu\text{L}$ 。

[0094] 2) 设置收集SYBR Green荧光信号的荧光检测通道, 将反应管放入定量PCR仪 (ABI HT7900) 开始扩增, 反应程序如表9:

[0095] 表9绝对定量PCR反应程序

[0096]

步骤	温度	时间	循环数
----	----	----	-----

[0097]

1	95℃	3 分钟	1
2	95℃	20 秒	35
	61℃	30 秒	
3	4 ℃	直至结束	1

[0098] 2. 定量PCR检测CDS:ABB57481.1基因的拷贝数:

[0099] 1) 按照定量PCR反应液II组成,配制定量PCR反应体系,取蓝藻的总DNA,标准品II的5个标准品以及空白对照品各1 μ L,体系各主要成分如下:

[0100] 定量PCR反应液II 19 μ L,DNA模板1 μ L;总体积20 μ L。

[0101] 2) 设置收集SYBR Green 荧光信号的荧光检测通道,将反应管放入定量PCR仪(ABI 7900HT)开始扩增,反应程序与步骤1)相同。

[0102] 3) 结果判断:

[0103] 基线范围的Ct值(循环数)由软件自动选择(如SDS2.4.1,ABI公司),设定阈值超过无规则扩增曲线的最高值。荧光PCR仪不同,所得基线范围的Ct值有所不同。图1为标准品I的的扩增曲线,以及根据该曲线得到的标准曲线。图2为标准品II的扩增曲线,以及根据该曲线得到的标准曲线。

[0104] 4) 结果分析:

[0105] 图3为正常蓝藻细胞an150基因的扩增曲线,所测Ct值在15~25之间,在标准品的线性范围之内,定量结果在 $8 \times 10^7 \sim 9 \times 10^8$ 拷贝/ μ L左右。图5为空白对照品的扩增曲线,结果无扩增信号。图6为正常蓝藻细胞CDS:ABB57481.1基因的扩增曲线,所测样本的Ct值在14~17之间,在标准品的线性范围之内,定量结果为CDS:ABB57481.1基因的拷贝数是 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 拷贝/ μ L左右。

[0106] 利用本试剂盒检测聚球藻细胞在正常的生理状态下,随着生长时间的延长,质粒拷贝数(以an150基因拷贝数计算)的变化情况。如表1所示。接种第0~6天,随着生长时间的延长,质粒拷贝数增加,接种第6天的质粒拷贝数最大,为 62 ± 22 个/细胞;在随后的3天内,质粒拷贝数降低。

[0107] 本试剂盒与用传统的OD值检测蓝藻细胞在环境胁迫下的响应相一致,说明本方法的可靠性,且灵敏度高,重现性好,为评价蓝藻细胞的生理状态提供了有力的检测方法。

[0108] 实施例3:

[0109] 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒在检测H₂O₂暴露情况下蓝藻质粒拷贝数中的应用,其步骤是:

[0110] 1. 定量PCR检测an150基因的拷贝数:

[0111] 1) 按照定量PCR反应液I组成,配制定量PCR反应体系,取蓝藻总DNA、标准品I的5个标准品以及空白对照品各1 μ L,体系各主要成分如下:

[0112] 定量PCR反应液I 19 μ L,DNA模板1 μ L;总体积20 μ L。

[0113] 2) 设置收集SYBR Green荧光信号的荧光检测通道,将反应管放入定量PCR仪(ABI HT7900)开始扩增,反应程序如表10:

[0114] 表10绝对定量PCR反应程序

[0115]

步骤	温度	时间	循环数
----	----	----	-----

[0116]

1	95℃	3 分钟	1
2	95℃	20 秒	35
	61℃	30 秒	
3	4 ℃	直至结束	1

[0117] 2. 定量PCR检测CDS:ABB57481.1基因的拷贝数:

[0118] 1) 按照定量PCR反应液II组成,配制定量PCR反应体系,取蓝藻的总DNA,标准品II的5个标准品以及空白对照品各1 μ L,体系各主要成分如下:

[0119] 定量PCR反应液II 19 μ L,DNA模板1 μ L;总体积20 μ L。

[0120] 2) 设置收集SYBR Green荧光信号的荧光检测通道,将反应管放入定量PCR仪(ABI 7900HT)开始扩增,反应程序与步骤1) 相同。

[0121] 3) 结果判断:

[0122] 基线范围的Ct值(循环数)由软件自动选择(如SDS2.4.1,ABI公司),设定阈值超过无规则扩增曲线的最高值。荧光PCR仪不同,所得基线范围的Ct值有所不同。图1为标准品I的的扩增曲线,以及根据该曲线得到的标准曲线。图2为标准品II的扩增曲线,以及根据该曲线得到的标准曲线。

[0123] 5) 结果分析:

[0124] 图4为H₂O₂暴露下蓝藻an150基因的扩增曲线,与正常的蓝藻细胞相比,H₂O₂暴露使蓝藻质粒的拷贝数发生变化(明显增加或减少)。图5为空白对照品的扩增曲线,结果无扩增信号。图7为H₂O₂暴露下蓝藻CDS:ABB57481.1基因的扩增曲线,H₂O₂暴露使蓝藻CDS:ABB57481.1基因的拷贝数发生变化。

[0125] 利用本试剂盒检测H₂O₂暴露情况下的聚球藻细胞内质粒拷贝数水平。从表2中可以发现,不同浓度H₂O₂暴露聚球藻细胞,质粒的拷贝数与对照组相比,发生了变化。具体来说,1~3mM H₂O₂暴露,随着H₂O₂暴露浓度的升高,质粒拷贝数减少,且均低于对照组。4~5mM H₂O₂暴露蓝藻细胞,质粒拷贝数增加,且均高于对照组。

[0126] 本试剂盒与用传统的OD值检测蓝藻细胞在环境胁迫下的响应相一致,说明本方法的可靠性,且灵敏度高,重现性好,为评价蓝藻细胞在环境胁迫下的响应提供了有力的检测方法。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 中国科学院水生生物研究所
- [0003] <120> 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒及应用
- [0004] <130> 一种检测蓝藻质粒的定量PCR试剂盒及应用
- [0005] <160> 10
- [0006] <170> PatentIn version 3.1
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 21
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] cgattcgccatgccgaagagg 21
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 19
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] actgtctcggcagcaattt 19
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <400> 3
- [0024] cgtctacctgctcgtttaca 21
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <400> 4
- [0030] agccctcgttagtcccagta 20
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 19
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列
- [0035] <400> 5
- [0036] catcgctggcttacaactg 19
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 18
- [0039] <212> DNA
- [0040] <213> 人工序列
- [0041] <400> 6

[0042]	gctctggctgctgatacg	18
[0043]	<210>	7
[0044]	<211>	19
[0045]	<212>	DNA
[0046]	<213>	人工序列
[0047]	<400>	7
[0048]	atctacggtcgggtctacg	19
[0049]	<210>	8
[0050]	<211>	20
[0051]	<212>	DNA
[0052]	<213>	人工序列
[0053]	<400>	8
[0054]	ttctcaacctcacctaagc	20
[0055]	<210>	9
[0056]	<211>	1401
[0057]	<212>	DNA
[0058]	<213>	基因序列
[0059]	<400>	9
[0060]	cgattcgcca tgccgaagag ggcttcgca tcgcccctca tgtagcttac tggtggcggt	60
[0061]	tttacgcccc aaaaacagcc ccaaccgtcg gccattggca acgcaatcca gaactggccc	120
[0062]	agagtctccg ccaaatcgca gacagtcacg gcgaagcggt ttatcgcggc gacctagcgc	180
[0063]	agcaagcgat cgccgccgct caggcagccg ggggtagtca aaccctcgcc gattgggccg	240
[0064]	agcatcaagt ggaatgggtg gagccttttt cagtcagcta cagcggggca gaggtttggg	300
[0065]	ccttgccacc caacagccaa ggcatgatca cgctgattgc gttggaactc ctcaagcggt	360
[0066]	ggcacgggcc agagtctgcc agtgaaagtg gcgcgaatca gcatcgtctg ctggaagtgg	420
[0067]	tgcgggctgc tctcgatctg ggctatcgag aacttggcga tctggcctgg atgccactaa	480
[0068]	cgccagcaga acttctcgac tccaagcggc tcgatcgcct ggctgcgacg ctgaagccga	540
[0069]	ccactgcagc gatttacaga cccaagtca caccgactgg cggcaccggt tatctctgca	600
[0070]	ctgccgatgc ccaaggacga atggtgtcct tgattcagtc caactatcag ggttttgggg	660
[0071]	cacgcgttga ggtgccagga acagggtga ctttcaataa tcgcggtgcc tgctttgtcc	720
[0072]	tcacccccga acatccaat caagtagggc cacagaagcg accctttcat accttgacgc	780
[0073]	cgggtttttt gactcgtaat ggtcaagcgc tcgccgcttt tggcatcatg ggcggccccg	840
[0074]	tccaatccca agcccaggtg cagttactgc atcgctcct cgatcgtggc gagaatgtcc	900
[0075]	aagcagcgat cgaagctccc cgctgggaag cccaaagcca cggcagagta cggattgagc	960
[0076]	cagggtttcc ggccacaacc tatgccagct tgacctcgc cggatcatgc cttgaacggc	1020
[0077]	tgacagaacc cagactgggt ggcgggcaga tcatttggcg acagcctcag ggttatggtg	1080
[0078]	ctgcttccga tccccgaaa gatggccaag cctcaggttt ctaggactct agccggcctg	1140
[0079]	aatcaggatg agccctacga tcgctttcta accccagtca gtggctatag aaacttgtat	1200
[0080]	ctggcagcac ttgttgactg tcccctcgcc cgactagcgt aaacatcgaa atatcaatcg	1260
[0081]	gtttatcggg aattctccgc agggctgtct agttcccga ttacagacag cctgccgata	1320
[0082]	aaccattggt ctgacctag gagtggatat gccgctgtat ctcgttgagg caaccctgcc	1380
[0083]	cgaaattgct gccgagacag t	1401

[0084]	<210>	10	
[0085]	<211>	1414	
[0086]	<212>	DNA	
[0087]	<213>	基因序列	
[0088]	<400>	10	
[0089]		cgctctacct gctcgtttac agggctatcg cggcaatctg gaagcgttg tgcgggaggt	60
[0090]		gttgaccatt gttgaactgc cagaaaattt agacctccag caagcggccc gccattgttc	120
[0091]		accagagacc caactccgcc tctgtctggc cagggcgatc gccatggaac ctgacattct	180
[0092]		gctcctcgat gagccctgtc tgccactgga ttcagcagcg acccttgctt ttgaagaact	240
[0093]		gctgctgceg ctctgcgatc gccacactat ctttctgatc accaacaatt tggcccaagc	300
[0094]		cggacgctgc gccacctaca cagccctgct ccatcctgtc ctgatcgacg aacagaaact	360
[0095]		gcccgtgacc aagctaattg agtttgacc gaccagccaa atctttcgcc agccccagea	420
[0096]		tccgatcacc gatgactttg tctgtggtcg acgctaaagc gtcgcaataa tagaaaagct	480
[0097]		gcttgcaag gaaatcacta tgaaaatctg gcgatcgctc agtctcttgc tcgtactgat	540
[0098]		tggcggctctg attttcggcg cgggccagc gttggctatc actcagctca atgtcaccac	600
[0099]		cgttgactat caacagtgc cggctgaact caattcagga gctgtcacca gtggcggtag	660
[0100]		tagtcgcca gccacctgct acttggtggt gggcacgctc aacaaccca gcaacaaaac	720
[0101]		cgtctacgac gtcgatatct acggctgggt ctacgacgcg aacggcgact cagtgatgca	780
[0102]		aaatcgcacg cgcttaggtg aggttgagga agtgccgccc ggcgatcctc ctttcgaaat	840
[0103]		tcggatcagc gttccggcca gccaacaga accactgcaa cttagcaat tcaaagcatc	900
[0104]		gggcttcagc gccacggtcc ggacccaact gctagaagaa ccggctgaat ctcgttttcta	960
[0105]		agaacgatcg ctgctcgggg gggcttcttg cagcgtaga ccgatcgcat caaccaagcg	1020
[0106]		gctgaccggc accagttcca gatccgactc gcagcgtcc tgtcccttgg gtaagagcgc	1080
[0107]		tcgttgaaag ccgagcttgg cagcctcctt gaggcgagc tcaacctgac tgacaggcgc	1140
[0108]		cacttgccc cctaagccga tttaccaat cagtaccgta tcgggcccga ggcagcagc	1200
[0109]		gcgaaactg gcgacaagag cgatcgcaat tcccaaatcc gcagcgggtt cagccacatt	1260
[0110]		cagcccgcca gccgaggcga cgtaggcatc gaattttgac agcggcaaac ccaagcgttt	1320
[0111]		ttctaagacc gccaaaattt gcagcaagcg gttgtactca attcccgtac cagcacggcg	1380
[0112]		cggtgaacta tagctactgg gactaacgag ggct	1414

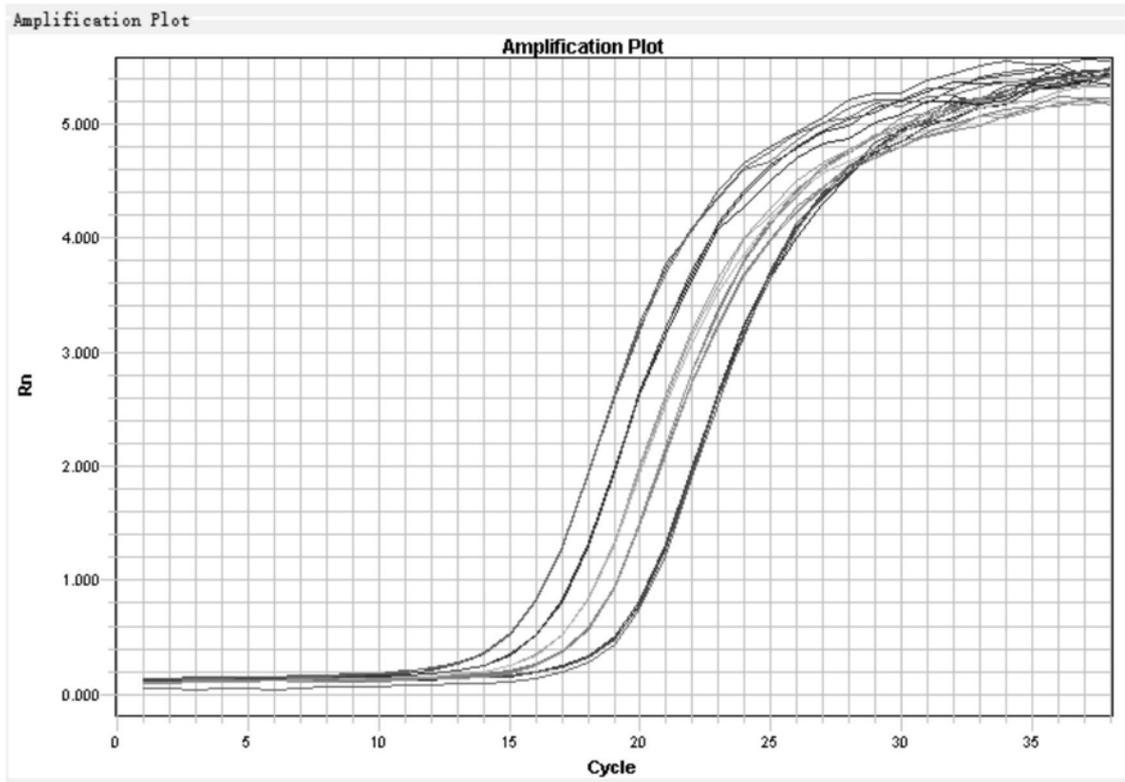


图1A

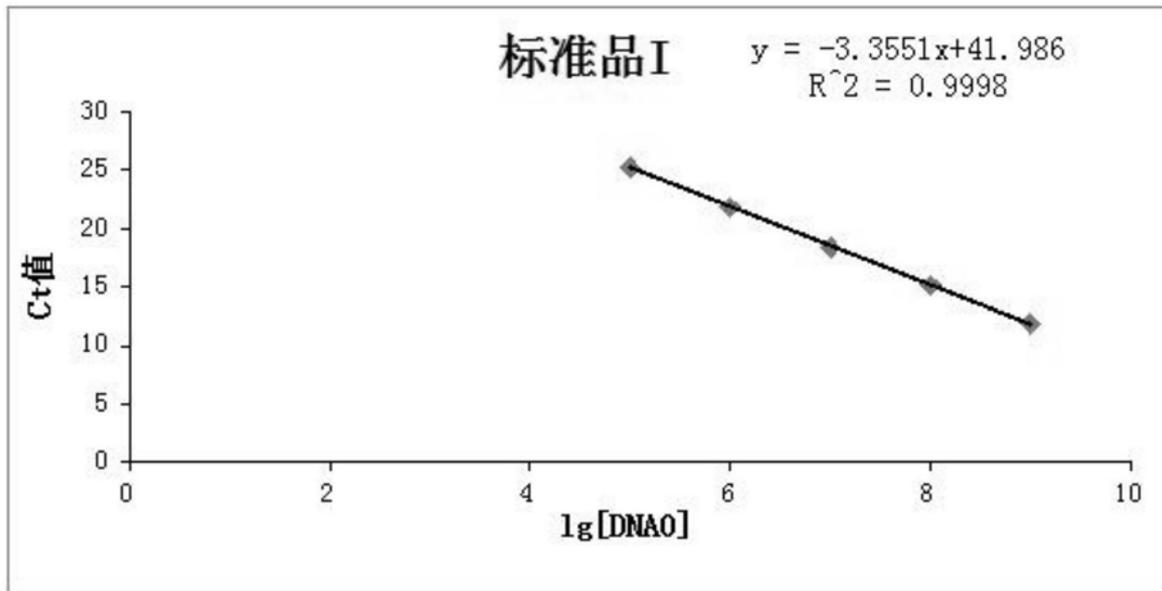


图1B

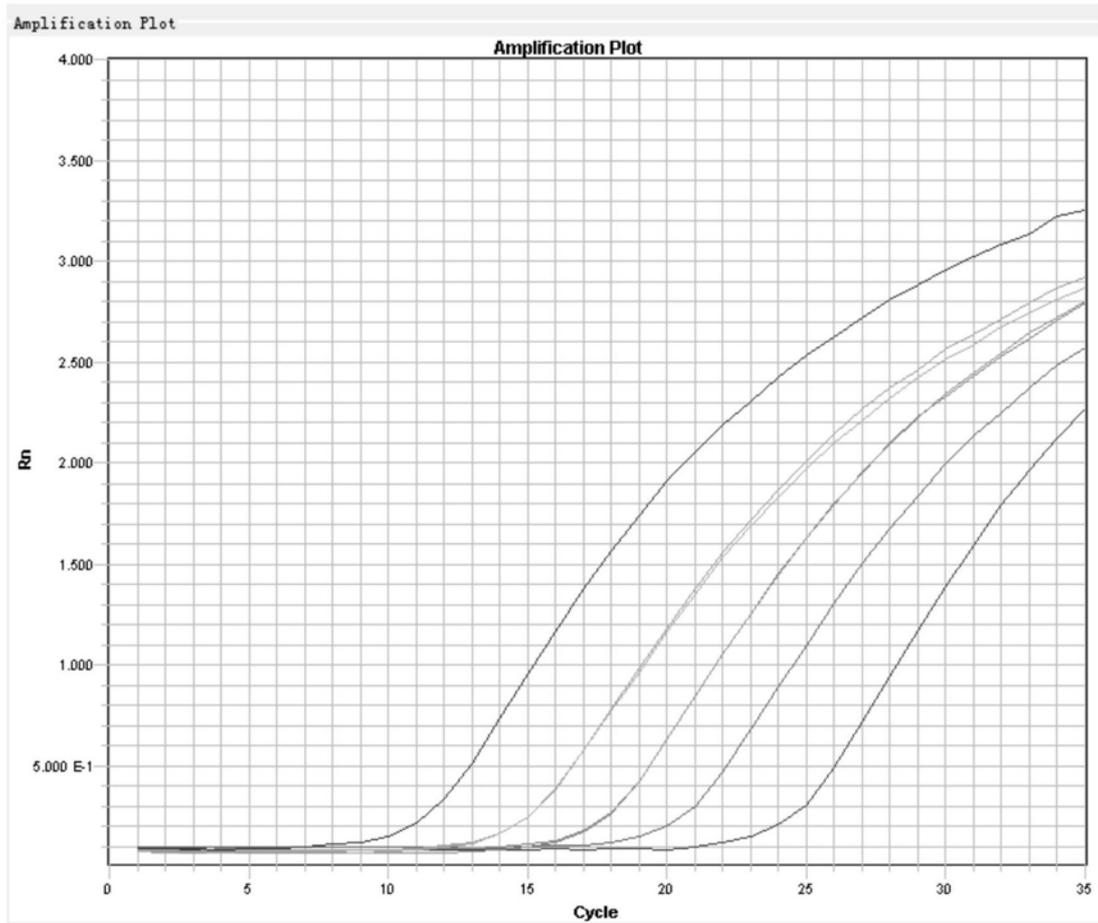


图2A

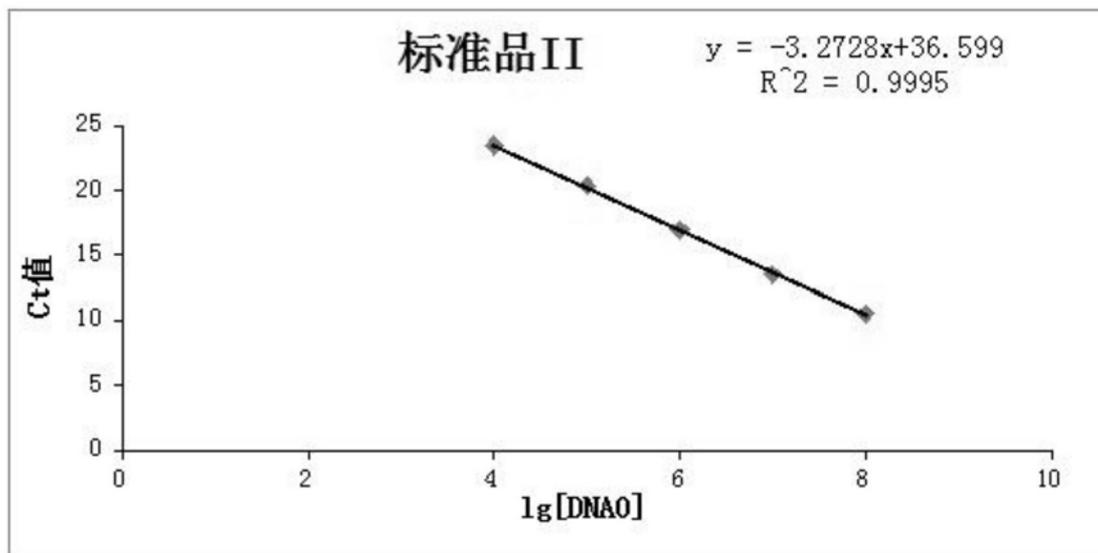


图2B

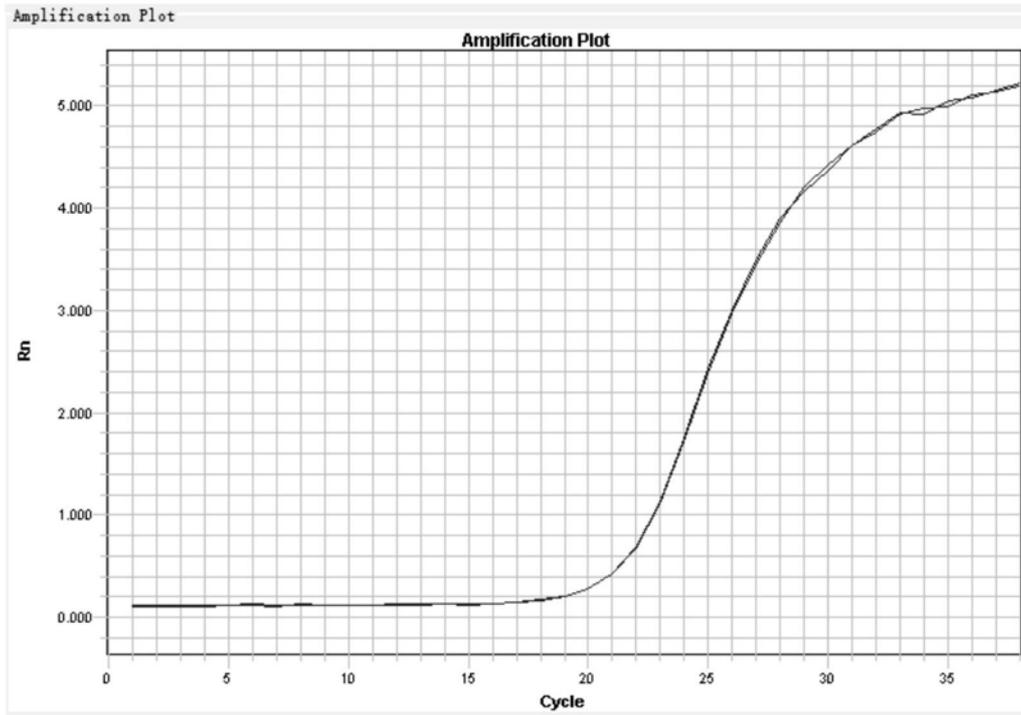


图3

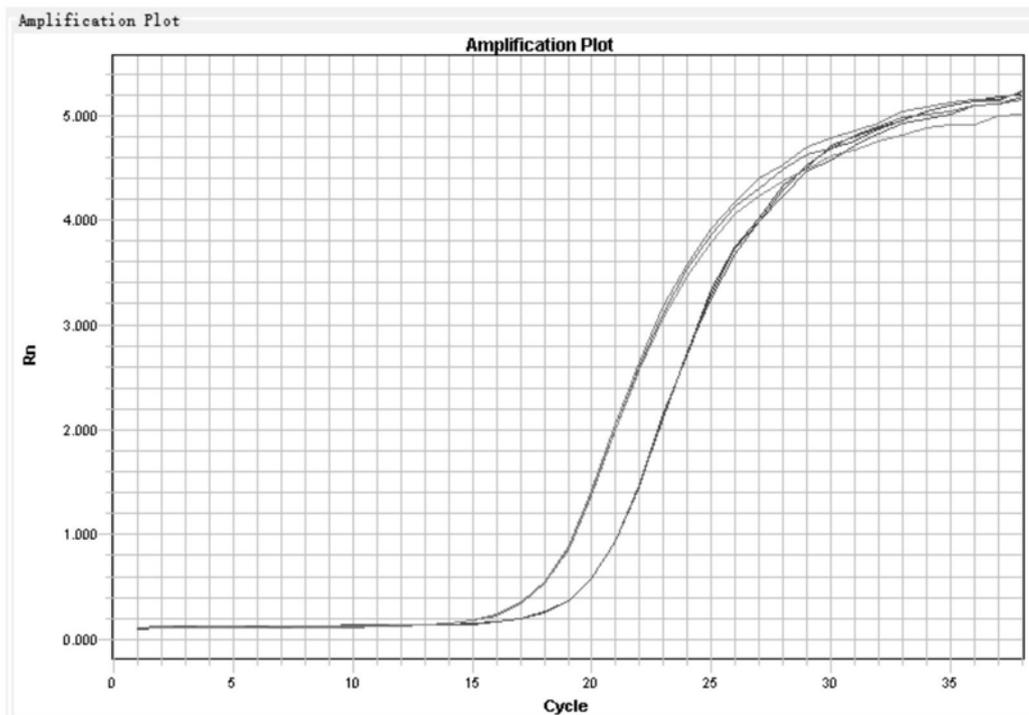


图4

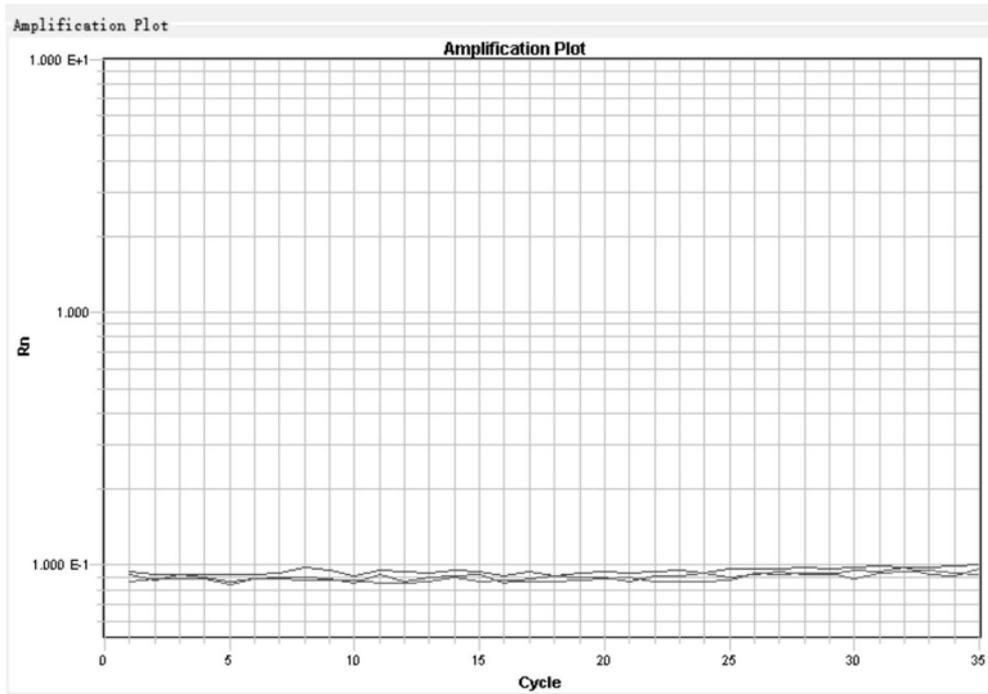


图5

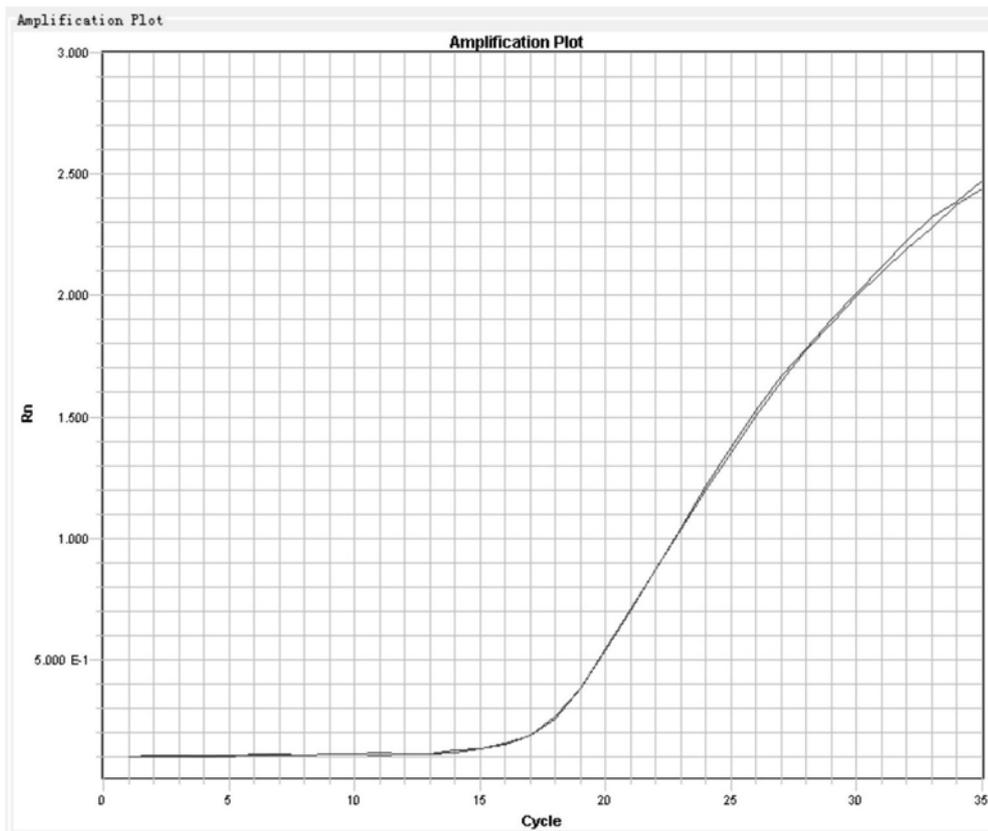


图6

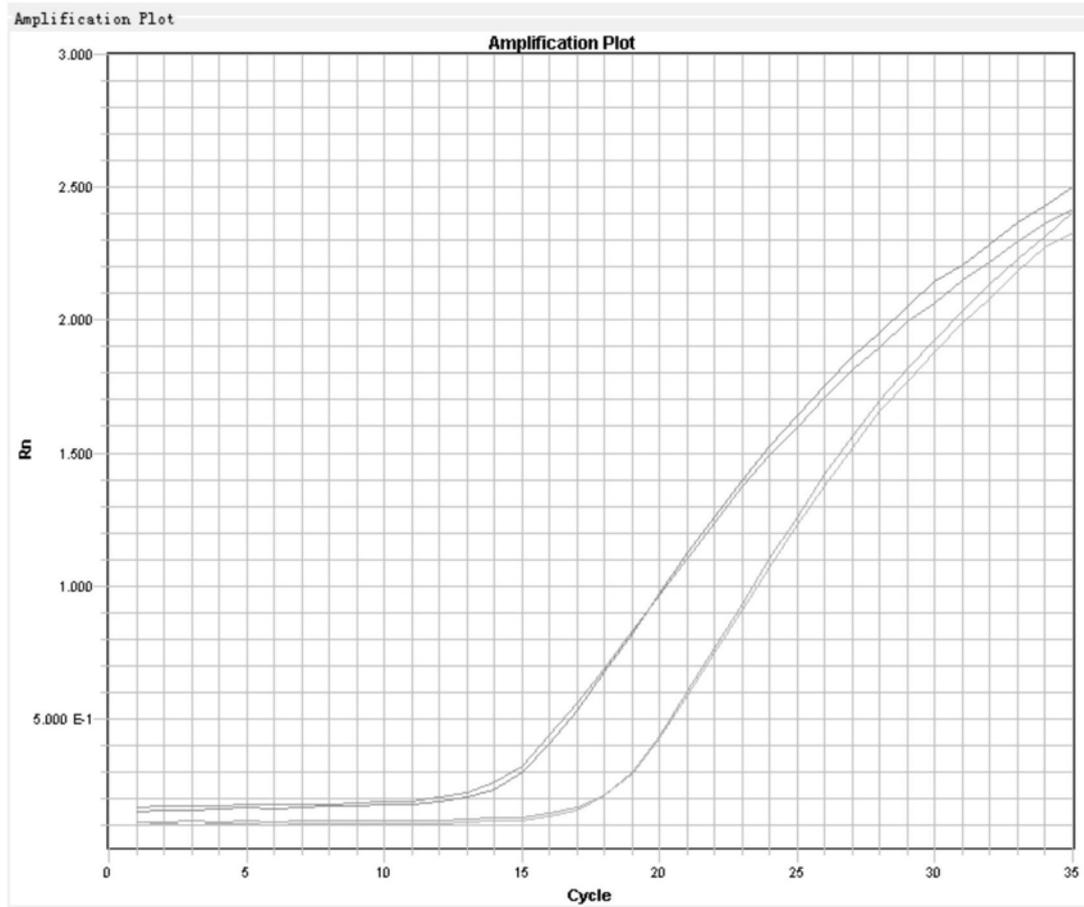


图7