



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111676294 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 22

(21) 申请号 202010441312.1

(22) 申请日 2020.05.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111676294 A

(43) 申请公布日 2020.09.18

(73) 专利权人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路
381号

(72) 发明人 黄少斌 杜至力

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 苏运贞

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

C12Q 1/6851 (2018.01)

G02F 11/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 107779512 A, 2018.03.09

齐吉芳. 影响剩余污泥减量细菌的实时定量
PCR研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库工
程科技I辑》.2008,第2008年卷(第11期),B027-
221.

孔倩等. 颤蚓(Tubificidae)生态污泥减量
技术研究进展.《2010年水处理新技术新工艺及
给(污)水厂运行管理高级研讨会论文集》.2011,
407-426.

Emamjomeh M. M.等.A Review of the Use
of Earthworms and Aquatic Worms for
Reducing Sludge Produced: An Innovative
Ecotechnology.《WASTE AND BIOMASS
VALORIZATION》.2018,第9卷(第9期),1543-
1557.

审查员 张丽华

权利要求书2页 说明书10页
序列表1页

(54) 发明名称

一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法
及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种污泥减量技术中颤蚓的
相对定量方法及其应用。本发明提供的颤蚓的相
对定量方法可通过“样品混合干燥+荧光定量PCR
+标线公式计算”的简便操作,快速获得不同组别
待测物样品中的颤蚓DNA拷贝数,进而通过直接
对比拷贝数大小判断不同组别待测物中颤蚓生
物量的相对多寡,解决了目前使用计数、称量等
常规方法难以完成颤蚓定量工作的问题,可实现
对比评价不同污泥减量反应器的污泥减量效果,
或者判断单一污泥减量反应器中颤蚓生长状态
的目的,具有广阔的应用前景。

1. 一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 采用荧光定量PCR测定一系列不同拷贝数浓度的颤蚓标准样品的CT值,以颤蚓标准样品的拷贝数浓度的以10为底的对数值为横坐标,CT值为纵坐标,建立颤蚓的相对定量标准曲线;

(2) 取不同来源的含有颤蚓的底物基质,各自混匀,烘干,冷却后作为待测物;

(3) 分别取相同质量的待测物进行DNA提取,溶解于相同体积的超纯水中,得到基因组DNA混合物溶液;

(4) 以与步骤(1)相同的反应体系和反应条件,进行荧光定量PCR,测定所述的基因组DNA混合物溶液的CT值,直接代入所述的相对定量标准曲线,得到待测物的拷贝数浓度;

(5) 根据不同来源的待测物的拷贝数浓度相对大小,即可直接判断不同来源的待测物中颤蚓生物量的相对多寡;

步骤(1)中所述的荧光定量PCR所用的引物的序列如下:

正向引物:5'-AGCTCGTAGTTGGATCTC-3' ;

反向引物:5'-CTGCTTTGAGCACTCTAA-3' ;

所述的荧光定量PCR所用的探针的序列为:

5'-AAAGCACTCAGCGAAGAGCAC-3' ;

所述的荧光定量PCR的反应体系为20 μ L:Premix EX Taq 10 μ L、正向引物 0.4 μ L、反向引物 0.4 μ L、探针 0.8 μ L、DNA 2 μ L、ddH₂O余量;

所述的荧光定量PCR的反应条件为:95 $^{\circ}$ C 60s;95 $^{\circ}$ C 5s、60 $^{\circ}$ C 20s,循环45次;

所述的颤蚓标准样品满足如下要求:颤蚓标准样品的拷贝数浓度的数量级范围为10¹~10¹¹,以10倍进行等分;

所述的颤蚓标准曲线满足如下要求:标准曲线的R²值>0.99;标准曲线的扩增效率在95%~105%之间;

步骤(2)中所述的烘干的条件为置于50 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中烘干2~3h。

2. 根据权利要求1中所述的污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的颤蚓标准样品通过包括如下步骤的方法制得:

a. 提取颤蚓基因组DNA;

b. 以提取的基因组DNA为模板进行PCR扩增,得到目的片段;

c. 将所得目的片段与载体进行连接,转化,对阳性克隆进行测序后,对测序正确的阳性克隆进行扩大培养;

d. 提取及纯化回收质粒,得到所述的目的片段的浓集溶液;测定所述的浓集溶液的DNA浓度,并换算成拷贝数浓度;

e. 对所得浓集溶液进行梯度稀释,即得到一系列不同拷贝数浓度的颤蚓标准样品。

3. 根据权利要求2中所述的污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法,其特征在于:

步骤b.中所述的PCR的反应体系为20 μ L:Premix Taq 10 μ L、正向引物 0.6 μ L、反向引物 0.6 μ L、DNA 2 μ L、ddH₂O余量;

步骤b.中所述的PCR的反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性30s、55 $^{\circ}$ C退火30s、72 $^{\circ}$ C复性30s,循环35次;72 $^{\circ}$ C延伸;

步骤d.中所述的换算所用的公式为:拷贝数浓度=DNA浓度*7.665*10⁹,拷贝数浓度的单

位为copies/ μL ,DNA浓度的单位为ng/ μL 。

4.根据权利要求1中所述的污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法,其特征在于:

所述的底物基质为污泥减量装置中的生物载体填料、污水处理装置中的活性污泥或自然环境底泥。

5.权利要求1~4任一项中所述的污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法在污水处理领域中的应用。

一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于污水污泥处理技术领域,具体涉及一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法及其应用。

背景技术

[0002] 城镇污水处理厂采用活性污泥法较多,具有剩余污泥产量大的缺点。剩余污泥含有大量难降解有机污染物、重金属和致病微生物等有害物质,处理处置难度大、成本高,并且处理过程中极易产生二次污染,已成为困扰城市发展建设、环境保护的巨大难题。

[0003] 为了减少污水处理过程中的剩余污泥产量,研究者们提出了一系列基于微型后生动物捕食污泥的污泥减量工艺。在相关污泥减量工艺实践中,颤蚓(*T.tubifex*)由于具有污泥捕食量大、捕食效果稳定并且容易获得的特点,成为了主要的接种后生动物。

[0004] 基于颤蚓捕食污泥的污泥减量工艺,其污泥减量效果取决于反应装置内部填料中颤蚓的种群密度。然而,在生产实践中,颤蚓常混在各种杂物中,或者与纤维状填料相互缠绕,难以分离定量。

[0005] 因此,亟需建立一种能简单、有效地定量污泥减量系统中污泥捕食颤蚓的方法。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0009] 一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法,包括如下步骤:

[0010] (1) 采用荧光定量PCR测定一系列不同拷贝数浓度的颤蚓标准样品的CT值,以颤蚓标准样品的拷贝数浓度的以10为底的对数值为横坐标,CT值为纵坐标,建立颤蚓的相对定量标准曲线;

[0011] (2) 取不同来源的含有颤蚓的底物基质,各自混匀,烘干,冷却后作为待测物;

[0012] (3) 分别取相同质量的待测物进行DNA提取,溶解于相同体积的超纯水中,得到基因组DNA混合物溶液;

[0013] (4) 以与步骤(1)相同的反应体系和反应条件,进行荧光定量PCR,测定所述的基因组DNA混合物溶液的CT值,直接代入所述的相对定量标准曲线,得到待测物的拷贝数浓度;

[0014] (5) 根据不同来源的待测物的拷贝数浓度相对大小,即可直接判断不同来源的待测物中颤蚓生物量的相对多寡。

[0015] 步骤(1)中所述的荧光定量PCR所用的引物的序列如下:

[0016] 正向引物:5'-AGCTCGTAGTTGGATCTC-3';

[0017] 反向引物:5'-CTGCTTTGAGCACTCTAA-3';

[0018] 步骤(1)中所述的荧光定量PCR所用的探针的序列为:5'-

AAAGCACTCAGCGAAGAGCAC-3'。

[0019] 步骤(1)中所述的荧光定量PCR的反应体系优选为20 μ L:Premix EX Taq 10 μ L、正向引物0.4 μ L、反向引物0.4 μ L、探针0.8 μ L、DNA 2 μ L、ddH₂O余量。

[0020] 步骤(1)中所述的荧光定量PCR的反应条件优选为:95℃60s;95℃5s、60℃20s,循环45次。

[0021] 步骤(1)中所述的颤蚓标准样品通过包括如下步骤的方法制得:

[0022] a.提取颤蚓基因组DNA;

[0023] b.以提取的基因组DNA为模板进行PCR扩增,得到目的片段;

[0024] c.将所得目的片段与载体进行连接,转化,对阳性克隆进行测序后,对测序正确的阳性克隆进行扩大培养;

[0025] d.提取及纯化回收质粒,得到所述的目的片段的浓集溶液;测定所述的浓集溶液的DNA浓度,并换算成拷贝数浓度;

[0026] e.对所得浓集溶液进行梯度稀释,即得到一系列不同拷贝数浓度的颤蚓标准样品;

[0027] 步骤a.中所述的颤蚓优选活性强、色泽鲜红的颤蚓。颤蚓可以直接从污水处理剩余污泥中挑选,也可以从市面上购买。

[0028] 步骤a.中所述的提取优选使用软体动物组织DNA提取试剂盒进行。

[0029] 步骤b.中所述的PCR所用的引物的序列如下:

[0030] 正向引物:5'-AGCTCGTAGTTGGATCTC-3';

[0031] 反向引物:5'-CTGCTTTGAGCACTCTAA-3';

[0032] 步骤b.中所述的PCR的反应体系优选为20 μ L:Premix Taq 10 μ L、正向引物0.6 μ L、反向引物0.6 μ L、DNA 2 μ L、ddH₂O余量。

[0033] 步骤b.中所述的PCR的反应条件优选为:95℃预变性5min;95℃变性30s、55℃退火30s、72℃复性30s,循环35次;72℃延伸。

[0034] 步骤c.中所述的阳性克隆优选通过蓝白斑筛选法制备得到。

[0035] 步骤d.中所述的换算所用的公式为:拷贝数浓度(copies/ μ L)=DNA浓度(ng/ μ L)*7.665*10⁹。

[0036] 步骤(1)中所述的颤蚓标准样品优选满足如下要求:颤蚓标准样品的拷贝数浓度的数量级范围为10¹~10¹¹,以10倍进行等分。

[0037] 步骤(1)中所述的颤蚓标准曲线优选满足如下要求:标准曲线的R²值>0.99;标准曲线的扩增效率(E值)在95%~105%之间。

[0038] 步骤(2)中所述的底物基质包括但不限于污泥减量装置中的生物载体填料、污水处理装置中的活性污泥或自然环境底泥。

[0039] 步骤(2)中所述的烘干的条件优为置于50℃~70℃鼓风干燥箱中烘干2~3h;更优选为置于60℃鼓风干燥箱中烘干3h。

[0040] 步骤(2)中所述的冷却的条件优选为置于干燥皿中冷却至室温。

[0041] 上述污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法在污水处理领域中的应用。

[0042] 本发明的原理:本发明首先通过分离提取清洗干净的鲜活颤蚓组织,并经过包含DNA提取,目的基因片段扩增、回收,建立目的基因DNA浓度(拷贝数)梯度,测得对应梯度CT

值在内的一系列流程步骤,建立用于颤蚓相对定量的CT值-颤蚓拷贝数标准曲线。获得标准曲线后,通过低温烘干去除水分干扰,再称取相同重量的多组含颤蚓待测物样品,提取DNA后直接测定DNA溶液CT值,测得的CT值直接代入标准曲线公式可获得不同组别含颤蚓待测物的颤蚓DNA拷贝数。含有更多颤蚓生物量的同等质量脱水待测物,可测得更高的颤蚓DNA拷贝数数值,因此,通过直接对比拷贝数数值大小,即可判断不同组别待测物中颤蚓生物量的相对多寡。

[0043] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0044] 本发明的剩余污泥减量装置中颤蚓的相对定量方法,可通过“样品混合干燥+荧光定量PCR+标线公式计算”的简便操作,快速获得不同组别待测物样品中的颤蚓DNA拷贝数,进而通过直接对比拷贝数大小判断不同组别待测物中颤蚓生物量的相对多寡,解决了目前使用计数、称量等常规方法难以完成颤蚓定量工作的问题。具体如下:

[0045] 1) 常规的称量、计数方法难以应用于颤蚓定量工作。颤蚓具有较强的活性污泥捕食能力,目前有人将其用于建立污水处理厂剩余污泥减量工艺,其中,工艺的污泥减量效果取决于反应装置内部填料中的颤蚓数量。然而,在生产实践中,由于颤蚓与各种纤维状杂质相互缠绕难以分离,活性污泥、无机杂质干扰,不同样品之间含水率差别大等原因,导致难以采用常规方法开展颤蚓定量工作。

[0046] 2) 本发明方法可对待测物中颤蚓进行快速相对定量分析。为了解决基于颤蚓捕食的剩余污泥减量反应器中颤蚓的定量问题,本发明建立了一种全新的污泥捕食颤蚓相对定量方法。利用本发明的测试方法,可在不同的污泥减量反应器之间,或者同一反应器的不同运行阶段之间,快速测得其中的颤蚓DNA拷贝数,拷贝数的数值大小可直接用于判断不同组别待测物中颤蚓生物量的相对多寡,最终达到对比评价不同污泥减量反应器的污泥减量效果,或者判断单一污泥减量反应器中颤蚓生长状态的目的。

具体实施方式

[0047] 下面结合具体实施例对本发明作进一步具体详细描述,但本发明的实施方式不限于此,对于未特别注明的技术参数,可参经常规技术进行。

[0048] 一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法,包括如下步骤:

[0049] 1. 颤蚓基因组的提取

[0050] 从已运行的剩余污泥减量反应装置的填料表面挑选活性强、色泽鲜红的颤蚓,使用无酶水冲洗干净后,分离收集10~20mg颤蚓组织,使用软体动物组织DNA提取试剂盒(D3128-02 Mollusc DNA Mini Kit, Magen),根据其说明书所述步骤进行颤蚓DNA提取,获得20μL DNA溶液。

[0051] 2. 颤蚓目的基因片段浓集溶液的制备

[0052] 2.1 普通PCR

[0053] 提取颤蚓的DNA样品作为模板,运用正向和反向引物,对目的片段进行普通PCR扩增,扩增出大量的颤蚓DNA目的片段。PCR扩增采用20μL体系共5组(平行样),同时添加以无菌水替代模板的阴性对照。PCR工作部分的引物信息和20μL体系见下表1和表2。

[0054] 表1颤蚓DNA目的片段扩增引物信息

[0055]

正向引物信息	5' -AGC TCG TAG TTG GAT CTC-3'
--------	--------------------------------

反向引物信息	5'-CTG CTT TGA GCA CTC TAA-3'
--------	-------------------------------

[0056] 表2颤蚓DNA样品PCR的20μL体系组分

[0057]	溶液组分	Premix Taq	正向引物	反向引物	颤蚓DNA	ddH ₂ O	溶液总量
	添加量	10μL	0.6μL (10μmol/L)	0.6μL (10μmol/L)	2μL (90ng/μL)	6.8μL	20μL

[0058] 普通PCR的反应条件为：(1) 预变性：95℃ 5min→(2) 变性：95℃ 30s→(3) 退火：55℃ 30s→(4) 复性：72℃ 30s→(6) 循环 (2~4)：35次→(7) 延伸：72℃。

[0059] 2.2颤蚓DNA样品PCR产物电泳

[0060] 采用1.5%琼脂糖凝胶电泳。使用20ml TAE (1X) 溶解0.3g琼脂糖后，每100ml的琼脂糖中加入5~10μL核酸染料。待胶块凝固，放入电泳槽中，在左侧凹槽中添加DNA Maker 4 μL在右侧5个凹槽中依次添加5组PCR产物 (平行样) 各7μL，进行电泳。电泳完毕后，对胶块上目的片段长度符合要求 (119bp左右) 且阴性对照无条带的样品，进行切胶回收质粒。

[0061] 2.3切胶回收

[0062] 将电泳后符合要求的条带切下，回收至1.5ml离心管中，按凝胶回收试剂盒说明书进行胶块DNA回收，同时测定DNA浓度。

[0063] 2.4连接与转化

[0064] 连接与转化按以下步骤进行：

[0065] (1) 在离心管中配制全量为10μL的连接与转化溶液体系，10μL体系组分见下表3。

[0066] (2) 将离心管放入PCR仪中，使用16℃、60min的运行参数连接载体和DNA。

[0067] (3) 将离心管内全量10μL加入至100μL JM109感受态细胞溶液中，先于冰水混合物中放置30min，再放入42℃水浴锅中加热42s，最后放入冰水混合物中放置1min。

[0068] (4) 于步骤 (3) 混合液中加入900μL SOC培养基，于37℃的摇床上振荡培养60min。

[0069] 表3 DNA目的片段连接与转化的10μL体系组分

[0070]	溶液组分	MD19-T Vector 1μL	回收的DNA	Solution I
	添加量	1μL	4μL	5μL

[0071] 2.5蓝白斑筛选实验

[0072] 此步操作进行前先将超净工作台中的紫外灯打开照射至少20分钟，尽量排除其他可能存在的污染。蓝白斑筛选实验按以下步骤进行：

[0073] (1) 在完成2.4步骤的菌液中添加20mg/ml X-Gal 40μL，500mM IPTG (异丙基-b-D-硫代半乳糖苷) 5μL，100mg/ml Ampicilin (氨苄青霉素，AMP) 20μL。

[0074] (2) 取步骤 (1) 混合液约4~5μL，使用L型涂布棒将其均匀涂抹于平板上。

[0075] (3) 将涂好的平板倒置于37℃的恒温培养箱中培养过夜。

[0076] (4) 于次日早上将培养基取出放入4℃冰箱中2h，观察蓝白斑。

[0077] (5) 取灭菌的1.5ml离心管3个，分别在无菌环境中加入10μL无菌水，将3个白色单菌落分别挑进3个离心管中，做好标记。

[0078] 2.6白色单菌落PCR

[0079] 3份白色单菌落的PCR扩增采用20μL体系，同时添加以无菌水替代模板的阴性对照。PCR工作部分的引物信息见表1。20μL体系见下表4。

[0080] 表4白色菌落PCR的20μL体系组分

[0081]	溶液组分	Premix Taq	正向引物	反向引物	菌落溶液	ddH ₂ O	溶液总量
	添加量	10 μ L	0.6 μ L	0.6 μ L	2 μ L	6.8 μ L	20 μ L

[0082] 普通PCR的反应条件如下:

[0083] (1) 预变性:95℃5min→(2) 变性:95℃30s→(3) 退火:55℃30s→(4) 复性:72℃30s→(6) 循环(2~4):35次→(7) 延伸:72℃。

[0084] 2.7白色单菌落PCR产物电泳

[0085] 采用1.5%琼脂糖凝胶电泳。使用20ml TAE (1X) 溶解0.3g琼脂糖后,每100ml的琼脂糖中加入5~10 μ L核酸染料。待胶块凝固,放入电泳槽中,在左侧凹槽中添加DNA Maker 4 μ L在右侧5个凹槽中依次添加3组PCR产物各7 μ L,进行电泳。电泳完毕后,取跑出条带的菌液5 μ L,加入5 μ L Amp和5ml液体培养基过夜培养。次日早上,取培养后的溶液600 μ L测序,剩余的培养后溶液放入4℃冰箱中2h后,加入50ml的80%灭菌甘油保存。

[0086] 测序结果在NCBI (GenBank编号:JF412522.1) 上比对是否为目的基因片段,若比对结果正确,则扩大培养菌体提取质粒。

[0087] 2.8质粒提取

[0088] 按质粒回收试剂盒说明书进行质粒回收,回收得到的质粒DNA溶液即为颤蚓目的基因片段的浓集溶液。

[0089] 3.标准曲线的建立

[0090] (1) 将1 μ L质粒DNA样品放入酶标仪,将测量参数调整至OD260,测定回收的DNA产物的DNA浓度值。

[0091] (2) 按以下公式计算基因拷贝数:颤蚓目的片段DNA拷贝数(copies/ μ L)=DNA浓度(ng/ μ L)*7.665*10⁹。

[0092] (3) 将已知拷贝数的样品,使用无酶水(ddH₂O)按10倍浓度梯度稀释10次,获得共计11个已知浓度与拷贝数的待测样品,拷贝数的数量级范围为10¹~10¹¹。

[0093] (4) 取所有11个待测样品及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测定CT值,荧光定量PCR工作部分的探针信息见下表4,20 μ L体系见下表5。

[0094] 表5颤蚓DNA目的片段荧光定量PCR探针信息

[0095]	探针信息	5'-AAA GCA CTC AGC GAA GAG CAC-3'
--------	------	-----------------------------------

[0096] 表6荧光定量PCR的20 μ L体系组分

[0097]	溶液组分	Premix EX Taq	正向引物	反向引物	探针	DNA	ddH ₂ O	总量
	添加量	10 μ L	0.4 μ L (10 μ mol/L)	0.4 μ L (10 μ mol/L)	0.8 μ L (10 μ mol/L)	2 μ L	6.4 μ L	20 μ L

[0098] 荧光定量PCR的反应条件如下:

[0099] (a) 95℃60s→(b) 95℃5s→(c) 60℃20s→(d) 循环(b~c):45次。

[0100] (5) 以计算得出的样品拷贝数的以10为底的对数值为横坐标,荧光定量PCR测得的CT值为纵坐标,建立颤蚓的相对定量标准曲线。标准曲线要求:全部的标准曲线样品的对应CT值范围应在15~35之间;标准曲线的R²值>0.99;标准曲线的E值在95%~105%之间。

[0101] 4.颤蚓相对定量检测

[0102] (1) 在采用颤蚓捕食活性污泥的剩余污泥减量工艺装置中,取得包含了颤蚓,其他原生、后生动物,活性污泥及其他杂质的混合污泥。

[0103] (2) 将混合污泥混匀后,置于60℃鼓风干燥箱中烘干3h,随后置于干燥皿中冷却至室温。

[0104] (3) 取烘干、冷却后的混合物10~20mg,使用软体动物组织DNA提取试剂盒,根据其说明书所述步骤进行DNA提取,获得20μL DNA溶液。

[0105] (4) 取得的DNA溶液,以及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测定CT值,荧光定量PCR工作部分的探针信息表5,20μL体系见表6。荧光定量PCR的反应条件为:(a) 95℃60s→(b) 95℃5s→(c) 60℃20s→(d) 循环(b~c):45次。

[0106] (5) 将测得的DNA溶液CT值直接代入标准曲线公式,获得待测物样品中的颤蚓DNA拷贝数。

[0107] (6) 重复上述步骤(1)~(5),获得多个不同组别的待测物样品中的颤蚓DNA拷贝数,根据拷贝数数值大小直接判断不同组别待测物中颤蚓生物量的相对多寡。

[0108] 实施例1对比分析不同污水处理厂生化池中的颤蚓含量多寡

[0109] 使用本发明的颤蚓相对定量检测方法,操作步骤如下:

[0110] 1) 在污水处理厂A和污水处理厂B(均位于广东省广州市)生化池检修期间分别采集生化池好氧区不同区域底泥,各自混合组成混合底泥A和混合底泥B。

[0111] 2) 另取底泥样品,从中挑选活性强、色泽鲜红的颤蚓,使用无酶水冲洗干净后,分离收集20mg颤蚓组织,使用软体动物组织DNA提取试剂盒,提取获得20μL DNA溶液。

[0112] 3) 运用颤蚓DNA目的片段正向和反向引物(表1),共平行进行5组20μL体系(表2)的颤蚓目的片段普通PCR扩增。

[0113] 4) 5组颤蚓DNA目的片段PCR产物均采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳后对胶块上目的片段长度符合要求且阴性对照无条带的样品,进行胶块DNA回收,共计获得20μL颤蚓DNA目的片段溶液。

[0114] 5) 在离心管中配制链接与转化的10μL溶液体系(表3),将离心管放入PCR仪中,使用16℃、60min的运行参数连接载体和DNA。

[0115] 6) 将离心管内全量10μL加入至100μL JM109感受态细胞溶液中,于冰水混合物中放置30min,再放入42℃水浴锅中加热42s,再放入冰水混合物中放置1min,最后加入900μL SOC培养基,于37℃的摇床上振荡培养60min。

[0116] 7) 将超净工作台中的紫外灯打开照射至少20分钟,在完成振荡培养菌液中添加20mg/ml X-Gal 40μL,500mM IPTG 5μL,100mg/ml Ampicilin 20μL后,取混合液约5μL涂布平板,将平板倒置于37℃的恒温培养箱中培养过夜。

[0117] 8) 于次日早上将培养基取出放入4℃冰箱中2h,取灭菌的1.5ml离心管3个,分别在无菌环境中加入10μL无菌水,将3个白色单菌落分别挑进3个离心管中,做好标记。

[0118] 9) 采用表4的20μL体系和表1的引物信息开展白色单菌落PCR扩增,同时添加以无菌水替代模板的阴性对照。

[0119] 10) 使用20ml TAE (1X) 溶解0.3g琼脂糖后,加入2μL核酸染料制作胶块,凝固后放入电泳槽中,在左侧凹槽中添加DNA Maker 4μL,在右侧凹槽中依次添加3组白色单菌落PCR产物各7μL,进行电泳。

[0120] 11) 电泳完毕后,取跑出条带的菌液5 μ L,加入5 μ L Amp和5ml液体培养基过夜培养。次日早上,取培养后的溶液600 μ L测序,剩余溶液放入4℃冰箱中2h后,加入50ml的80%灭菌甘油保存。

[0121] 12) 测序结果在NCBI上比对确认后,扩大培养菌体提取质粒并按质粒回收试剂盒说明书进行质粒回收,回收得到的质粒DNA溶液即为颤蚓目的基因片段的浓集溶液。

[0122] 13) 将1 μ L基因片段的浓集溶液放入酶标仪,将测量参数调整至OD260,测得回收的DNA产物的浓度值为85.268ng/ μ L,根据公式:颤蚓目的片段DNA拷贝数(copies/ μ L)=DNA浓度(ng/ μ L)*7.665*10⁹,算得拷贝数为6.54*10¹¹copies/ μ L。

[0123] 14) 将已知拷贝数的样品,使用无酶水(ddH₂O)按10倍浓度梯度稀释10次,将所有11个待测样品及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测定CT值(探针信息见表5,20 μ L体系见表6)。

[0124] 15) 以计算得出的样品拷贝数的以10为底的对数值为横坐标,荧光定量PCR测得的CT值为纵坐标,获得颤蚓的相对定量标准曲线: $y = -3.3264x + 44.728$, $R^2 = 0.9972$ 。

[0125] 16) 将混合底泥A和混合底泥B置于60℃鼓风干燥箱中烘干3h,随后置于干燥皿中冷却至室温。

[0126] 17) 取烘干、冷却后的混合底泥A和混合底泥B各20mg,分别使用软体动物组织DNA提取试剂盒进行DNA提取,各获得20 μ L DNA溶液。

[0127] 18) 将获得的DNA溶液,以及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测得混合底泥A的CT值为17.34,混合底泥B的CT值21.29(探针信息见表6,20 μ L体系见表6),代入标准曲线公式,算得混合底泥A的颤蚓DNA拷贝数为1.71*10⁸copies/ μ L,混合底泥B的颤蚓DNA拷贝数为1.11*10⁷copies/ μ L。

[0128] 19) 根据混合底泥A的颤蚓DNA拷贝数(1.71*10⁸copies/ μ L) > 混合底泥B的颤蚓DNA拷贝数(1.11*10⁷copies/ μ L),判断混合底泥A中的颤蚓生物量大于混合底泥B中的颤蚓生物量。

[0129] 实施例2对比分析不同湿地底泥中的颤蚓含量多寡

[0130] 使用本发明的颤蚓相对定量检测方法,操作步骤如下:

[0131] 1) 在人工湿地A和自然湿地B中(均位于广东省广州市),分别采用底泥采集器收集湿地不同区域底泥,各自混合组成人工湿地底泥A和自然湿地底泥B。

[0132] 2) 从市场(广东省广州市)购买少量颤蚓,从中挑选活性强、色泽鲜红的颤蚓,使用无酶水冲洗干净后,分离收集20mg颤蚓组织,使用软体动物组织DNA提取试剂盒,提取获得20 μ L DNA溶液。

[0133] 3) 运用颤蚓DNA目的片段正向和反向引物(表1),共平行进行5组20 μ L体系(表2)的颤蚓目的片段普通PCR扩增。

[0134] 4) 5组颤蚓DNA目的片段PCR产物均采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳后对胶块上目的片段长度符合要求且阴性对照无条带的样品,进行胶块DNA回收,共计获得20 μ L颤蚓DNA目的片段溶液。

[0135] 5) 在离心管中配制链接与转化的10 μ L溶液体系(表3),将离心管放入PCR仪中,使用16℃、60min的运行参数连接载体和DNA。

[0136] 6) 将离心管内全量10 μ L加入至100 μ L JM109感受态细胞溶液中,于冰水混合物中

放置30min,再放入42℃水浴锅中加热42s,再放入冰水混合物中放置1min,最后加入900μL SOC培养基,于37℃的摇床上振荡培养60min。

[0137] 7) 将超净工作台中的紫外灯打开照射至少20分钟,在完成振荡培养菌液中添加20mg/ml X-Gal 40μL,500mM IPTG 5μL,100mg/ml Ampicilin 20μL后,取混合液约5μL涂布平板,将平板倒置于37℃的恒温培养箱中培养过夜。

[0138] 8) 于次日早上将培养基取出放入4℃冰箱中2h,取灭菌的1.5ml离心管3个,分别在无菌环境中加入10μL无菌水,将3个白色单菌落分别挑进3个离心管中,做好标记。

[0139] 9) 采用表4的20μL体系和表1的引物信息开展白色单菌落PCR扩增,同时添加以无菌水替代模板的阴性对照。

[0140] 10) 使用20ml TAE (1X) 溶解0.3g琼脂糖后,加入2μL核酸染料制作胶块,凝固后放入电泳槽中,在左侧凹槽中添加DNA Maker 4μL,在右侧凹槽中依次添加3组白色单菌落PCR产物各7μL,进行电泳。

[0141] 11) 电泳完毕后,取跑出条带的菌液5μL,加入5μLAmp和5ml液体培养基过夜培养。次日早上,取培养后的溶液600μL测序,剩余溶液放入4℃冰箱中2h后,加入50ml的80%灭菌甘油保存。

[0142] 12) 测序结果在NCBI上比对确认后,扩大培养菌体提取质粒并按质粒回收试剂盒说明书进行质粒回收,回收得到的质粒DNA溶液即为颤蚓目的基因片段的浓集溶液。

[0143] 13) 将1μL基因片段的浓集溶液放入酶标仪,将测量参数调整至OD260,测得回收的DNA产物的浓度值为91.395ng/μL,根据公式:颤蚓目的片段DNA拷贝数(copies/μL)=DNA浓度(ng/μL)*7.665*10⁹,算得拷贝数为7.01*10¹¹copies/μL。

[0144] 14) 将已知拷贝数的样品,使用无酶水(ddH₂O)按10倍浓度梯度稀释10次,将所有11个待测样品及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测定CT值(探针信息见表5,20μL体系见表6)。

[0145] 15) 以计算得出的样品拷贝数的以10为底的对数值为横坐标,荧光定量PCR测得的CT值为纵坐标,获得颤蚓的相对定量标准曲线: $y = -3.3122x + 44.689$, $R^2 = 0.9908$ 。

[0146] 16) 将人工湿地底泥A和自然湿地底泥B置于60℃鼓风干燥箱中烘干3h,随后置于干燥皿中冷却至室温。

[0147] 17) 取烘干、冷却后的人工湿地底泥A和自然湿地底泥B各20mg,分别使用软体动物组织DNA提取试剂盒进行DNA提取,各获得20μL DNA溶液。

[0148] 18) 将获得的DNA溶液,以及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测得人工湿地底泥A的CT值为27.46,自然湿地底泥B的CT值30.38(探针信息见表5,20μL体系见表6),代入标准曲线公式,算得人工湿地底泥A的颤蚓DNA拷贝数为1.59*10⁵copies/μL,自然湿地底泥B的颤蚓DNA拷贝数为12.09*10⁴copies/μL。

[0149] 19) 根据人工湿地底泥A的颤蚓DNA拷贝数(1.59*10⁵copies/μL) > 自然湿地底泥B的颤蚓DNA拷贝数(12.09*10⁴copies/μL),判断人工湿地底泥A中的颤蚓生物量大于自然湿地底泥B中的颤蚓生物量。

[0150] 实施例3对比分析不同的污泥减量装置中载体填料上的颤蚓含量多寡

[0151] 使用本发明的颤蚓相对定量检测方法,操作步骤如下:

[0152] 1) 在污泥减量装置A和污泥减量装置B(广东省广州市)中,分别采集反应器颤蚓培

养区域中不同位置的载体填料(各5个),各自混合组成污泥减量装置样品A和污泥减量装置样品B。

[0153] 2) 从市场(广东省广州市)购买少量颤蚓,从中挑选活性强、色泽鲜红的颤蚓,使用无酶水冲洗干净后,分离收集20mg颤蚓组织,使用软体动物组织DNA提取试剂盒,提取获得20μL DNA溶液。

[0154] 3) 运用颤蚓DNA目的片段正向和反向引物(表1),共平行进行5组20μL体系(表2)的颤蚓目的片段普通PCR扩增。

[0155] 4) 5组颤蚓DNA目的片段PCR产物均采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳后对胶块上目的片段长度符合要求且阴性对照无条带的样品,进行胶块DNA回收,共计获得20μL颤蚓DNA目的片段溶液。

[0156] 5) 在离心管中配制链接与转化的10μL溶液体系(表3),将离心管放入PCR仪中,使用16℃、60min的运行参数连接载体和DNA。

[0157] 6) 将离心管内全量10μL加入至100μL JM109感受态细胞溶液中,于冰水混合物中放置30min,再放入42℃水浴锅中加热42s,再放入冰水混合物中放置1min,最后加入900μL SOC培养基,于37℃的摇床上振荡培养60min。

[0158] 7) 将超净工作台中的紫外灯打开照射至少20分钟,在完成振荡培养菌液中添加20mg/ml X-Gal 40μL,500mM IPTG 5μL,100mg/ml Ampicilin 20μL后,取混合液约5μL涂布平板,将平板倒置于37℃的恒温培养箱中培养过夜。

[0159] 8) 于次日早上将培养基取出放入4℃冰箱中2h,取灭菌的1.5ml离心管3个,分别在无菌环境中加入10μL无菌水,将3个白色单菌落分别挑进3个离心管中,做好标记。

[0160] 9) 采用表4的20μL体系和表1的引物信息开展白色单菌落PCR扩增,同时添加以无菌水替代模板的阴性对照。

[0161] 10) 使用20ml TAE (1X) 溶解0.3g琼脂糖后,加入2μL核酸染料制作胶块,凝固后放入电泳槽中,在左侧凹槽中添加DNA Maker 4μL,在右侧凹槽中依次添加3组白色单菌落PCR产物各7μL,进行电泳。

[0162] 11) 电泳完毕后,取跑出条带的菌液5μL,加入5μL Amp和5ml液体培养基过夜培养。次日早上,取培养后的溶液600μL测序,剩余溶液放入4℃冰箱中2h后,加入50ml的80%灭菌甘油保存。

[0163] 12) 测序结果在NCBI上比对确认后,扩大培养菌体提取质粒并按质粒回收试剂盒说明书进行质粒回收,回收得到的质粒DNA溶液即为颤蚓目的基因片段的浓集溶液。

[0164] 13) 将1μL基因片段的浓集溶液放入酶标仪,将测量参数调整至OD260,测得回收的DNA产物的浓度值为88.471ng/μL,根据公式:颤蚓目的片段DNA拷贝数(copies/μL) = DNA浓度(ng/μL) * 7.665 * 10⁹,算得拷贝数为6.78 * 10¹¹ copies/μL。

[0165] 14) 将已知拷贝数的样品,使用无酶水(ddH₂O)按10倍浓度梯度稀释10次,将所有11个待测样品及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照,采用荧光定量PCR方法测定CT值(探针信息见表5,20μL体系见表6)。

[0166] 15) 以计算得出的样品拷贝数的以10为底的对数值为横坐标,荧光定量PCR测得的CT值为纵坐标,获得颤蚓的相对定量标准曲线: $y = -3.2627x + 44.759$, $R^2 = 0.9954$ 。

[0167] 16) 将污泥减量装置样品A和污泥减量装置样品B置于60℃鼓风干燥箱中烘干3h,

随后置于干燥皿中冷却至室温。

[0168] 17) 取烘干、冷却后的污泥减量装置样品A和污泥减量装置样品B各20mg, 记为A1、B1, 分别使用软体动物组织DNA提取试剂盒进行DNA提取, 各获得20 μ L DNA溶液。

[0169] 18) 将获得的DNA溶液, 以及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照, 采用荧光定量PCR方法测得污泥减量装置样品A1的CT值为13.87, 污泥减量装置样品B1的CT值12.19 (探针信息见表5, 20 μ L体系见表6), 代入标准曲线公式, 算得污泥减量装置样品A1的颤蚓DNA拷贝数为 2.93×10^9 copies/ μ L, 污泥减量装置样品B1的颤蚓DNA拷贝数为 9.60×10^9 copies/ μ L。

[0170] 19) 根据污泥减量装置样品B1的颤蚓DNA拷贝数 (9.60×10^9 copies/ μ L) > 污泥减量装置样品A1的颤蚓DNA拷贝数 (2.93×10^9 copies/ μ L), 判断污泥减量装置样品B1中的颤蚓生物量大于污泥减量装置样品A1中的颤蚓生物量。

[0171] 20) 验证试验: 另取烘干、冷却后的污泥减量装置样品A和污泥减量装置样品B各20mg, 记为A2、B2, 分别放入100目网式滤布中, 浸入清水中不断淘洗, 去除泥沙、载体框架、载体纤维丝、活性污泥等全部杂质; 将清洗后的样品静置沥干3min后, 使用分析天平称得样品A2的颤蚓湿重为2.313g, 样品B2的颤蚓湿重为6.638g。采用颤蚓的经验干湿重比例系数0.235, 算得样品B2的颤蚓干重 (1.56g) > 样品A2的颤蚓干重 (0.54g)。验证试验表明, A2、B2实验结果与A1、B1实验结果一致。

[0172] 实施例4对比分析单一污泥减量装置中不同运行阶段载体填料上的颤蚓含量多寡

[0173] 使用本发明的颤蚓相对定量检测方法, 操作步骤如下:

[0174] 1) 在污泥减量装置C (广东省广州市) 中, 分别于接种颤蚓运行4周后和接种颤蚓运行8周后采集反应器颤蚓培养区域中不同位置的载体填料 (各5个), 各自混合组成污泥减量装置样品C1和污泥减量装置样品C2。

[0175] 2) 将污泥减量装置样品C1和污泥减量装置样品C2置于60 $^{\circ}$ C鼓风干燥箱中烘干3h, 随后置于干燥皿中冷却至室温。

[0176] 3) 取烘干、冷却后的污泥减量装置样品C1和污泥减量装置样品C2各20mg, 分别使用软体动物组织DNA提取试剂盒进行DNA提取, 各获得20 μ L DNA溶液。

[0177] 4) 将获得的DNA溶液, 以及1个以等量无酶水代替质粒的阴性对照, 采用荧光定量PCR方法测得污泥减量装置样品C1的CT值为14.21, 污泥减量装置样品C2的CT值12.15 (探针信息见表5, 20 μ L体系见表6), 代入实施例3中所述的标准曲线公式: $y = -3.2627x + 44.759$, $R^2 = 0.9954$, 算得污泥减量装置样品C1的颤蚓DNA拷贝数为 2.31×10^9 copies/ μ L, 污泥减量装置样品C2的颤蚓DNA拷贝数为 9.87×10^9 copies/ μ L。

[0178] 5) 根据污泥减量装置样品C2的颤蚓DNA拷贝数 (9.87×10^9 copies/ μ L) 约为污泥减量装置样品C1的颤蚓DNA拷贝数 (2.31×10^9 copies/ μ L) 的4.3倍, 判断污泥减量装置中颤蚓生物量的稳定速度适宜, 颤蚓生长状况良好。

[0179] 上述实施例为本发明较佳的实施方式, 但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制, 其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化, 均应为等效的置换方式, 都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 华南理工大学	
[0003]	<120> 一种污泥减量技术中颤蚓的相对定量方法及其应用	
[0004]	<160> 3	
[0005]	<170> SIP0SequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 18	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0010]	<220>	
[0011]	<223> 正向引物	
[0012]	<400> 1	
[0013]	agctcgtagt tggatctc	18
[0014]	<210> 2	
[0015]	<211> 18	
[0016]	<212> DNA	
[0017]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0018]	<220>	
[0019]	<223> 反向引物	
[0020]	<400> 2	
[0021]	ctgctttgag cactctaa	18
[0022]	<210> 3	
[0023]	<211> 21	
[0024]	<212> DNA	
[0025]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0026]	<220>	
[0027]	<223> 探针	
[0028]	<400> 3	
[0029]	aaagcactca gcgaagagca c	21