

权 利 要 求 书

1、一种肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、DNA 提取：采用粪便基因组提取试剂盒，将肉鸡盲肠内容物总 DNA 提取于 1.5mLEP 管中，测其核酸浓度，灭菌超纯水稀释到 20ng/μL，
5 与原液一起保存于-20℃冰箱，待用；

步骤 2、合成肉鸡肠道微生物 PCR 引物；所述 PCR 引物的上游引物为 CGATGAGTGCTAGGTGTTGGA，核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示；下游引物为 CAAGATGTCAAGACCTGGTAAG，序列如 SEQ ID NO.2 所示；

步骤 3、构建肉鸡肠道微生物质粒；~~—~~：

10 1) 以肉鸡肠道内容物总 DNA 为模板，用步骤 1 中的引物进行 PCR 扩增，按照 PCR 反应体系扩增产物，琼脂糖凝胶电泳，用琼脂糖凝胶 DNA 小量回收试剂盒回收纯化目的片段，测 OD 值，-20℃保存；

2) 用试剂盒将 1) 中纯化的目的片段连结在载体上并转化，按照说明书制备 10 μL 连接混合液，16℃，30min；1 μL 混合液加入 10 μL DH5 α 冰上 30min，做一个重复组；42℃热激 90s，冰上 3min；500 μL 的 LB 培养基，37℃，复苏 45-60min，220RPM/min；4000RPM/min 离心，2min，弃 400 μL，重悬，LA 平板上涂板，37℃过夜培养，不超过 16h；

3) 挑取单菌落白斑，于 10uL 液体 LA 培养基中，取 1uL 进行菌落 PCR，剩下的加 500uL 的液体 LA 培养基；PCR 结果阳性的菌液测序；

20 4) 测序结果在 blast 上比对，阳性结果菌液发酵后试剂盒提取质粒；

5) 质粒测序，NCBI 上 blast 比对结果，挑选与目的菌株匹配的质粒，检测 DNA 浓度，保存于-20℃冰箱，备用。

步骤 4、制作标准品；

步骤 5、进行样品检测。

25 ~~2、根据权利要求 1 所述的肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，所述步骤 3 中构建肉鸡肠道微生物质粒具体为：~~

~~1) 以肉鸡肠道内容物总 DNA 为模板，用步骤 1 中的引物进行 PCR 扩增，按照 PCR 反应体系扩增产物，琼脂糖凝胶电泳，用琼脂糖凝胶 DNA 小~~

~~量回收试剂盒回收纯化目的片段，测 OD 值，20℃保存；~~

~~2) 用试剂盒将 1) 中纯化的目的片段连结在载体上并转化，按照说明书制备 10 μL 连接混合液，16℃，30min；1 μL 混合液加入 10 μL DH5α 冰上 30min，做一个重复组；42℃热激 90s，冰上 3min；500 μL 的 LB 培养基，37℃，复苏 45-60min，220RPM/min；4000RPM/min 离心，2min，弃 400 μL，重悬，LA 平板上涂板，37℃过夜培养，不超过 16h；~~

~~3) 挑取单菌落白斑，于 10uL 液体 LA 培养基中，取 1uL 进行菌落 PCR，剩下的加 500uL 的液体 LA 培养基；PCR 结果阳性的菌液测序；~~

~~4) 测序结果在 blast 上比对，阳性结果菌液发酵后试剂盒提取质粒；~~

~~5) 质粒测序，NCBI 上 blast 比对结果，挑选与目的菌株匹配的质粒，检测 DNA 浓度，保存于 20℃冰箱，备用。~~

32、根据权利要求 1 所述的肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，所述步骤 4 中制备标准品具体为：将质粒按十倍稀释法，用灭菌超纯水稀释成 10^{-1} - 10^{-9} 的浓度梯度，取 9 个无菌的 1.5mLEP 管，根据浓度由大到小依次编号 1-9，并各加入 90 μL 灭菌的超纯水，取肉鸡肠道微生物标准质粒原液 10 μL 于试管中，快速轻柔吹打 20-30 次，重复该步骤至 9 号 EP 管，得到包括原液的 10 个梯度的标准品。

43、根据权利要求 32 所述的肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，所述步骤 5 中样品检测具体为：选取 3-7 号标准品与样品稀释液一起进行荧光定量 PCR 反应；试验所用设备为 Bio-Rad 96 孔荧光定量 PCR 仪。

54、根据权利要求 21 或 43 所述的肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，PCR 反应的反应体系为上游引物和下游引物各 0.8 μL；RNase-Free ddH₂O 7.4 μL；SYBR GREEN Supermix 10 μL；DNA 模板 1 μL。

65、根据权利要求 43 所述的肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，所述荧光定量 PCR 反应的反应条件：预变性阶段，1 次循环，温度 95℃，预变性 30s，不采集荧光信号；PCR 反应阶段，40 次循环，温度 95℃，变性 5s，退火温度 50-60℃，时间 30s，温度 72℃，延伸 20s，采集荧光信号；溶解曲线，72℃到 95℃，每 2s 上升 0.5℃。

76、根据权利要求 1 所述的肉鸡肠道微生物的定量检测方法，其特征在于，所述微生物为总菌、乳杆菌或大肠杆菌中的一种。