

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810072135.3

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 4 月 8 日

[11] 公开号 CN 101402994A

[22] 申请日 2008.11.18

[21] 申请号 200810072135.3

[71] 申请人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市金山福建农林大
学生命科学学院

[72] 发明人 朱 坚 江玉姬 谢宝贵 邓优锦
刘新锐

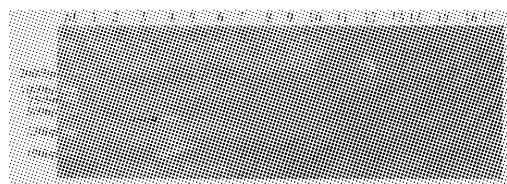
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法

[57] 摘要

一种利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法，包括菌丝培养与收集、基因组 DNA 的提取、SCAR-PCR 分子标记的检测建立和 SCAR-PCR 产物的检测。本发明提供的利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种的方法，具有灵敏度高，所需要的 DNA 用量少，与常规形态学检测、拮抗试验、出菇试验相比，具有检测时间短、准确性高、容易判断、重复性好等优点。为猴头菇种质资源的利用和新品种的登记工作，提供了快速有效的菌种鉴定体系，对科研和生产具有重要的意义。



1、一种利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法，包括菌丝培养与收集、基因组 DNA 的提取、SCAR-PCR 分子标记的检测建立和 SCAR-PCR 产物的检测；其特征在于

(1) SCAR-PCR 分子标记的检测，使用的检测引物是猴杰 F/R，其中，猴杰 F 是 5'- CGCAACCAAAACAAAAACGACAATG -3'，猴杰 R 是 5'- CGTTCCACCCCTACGTTTAGCCTCA -3'；

(2) SCAR-PCR 分子标记的检测建立，SCAR-PCR 扩增体系为 10× PCR buffer 2.5 μl， 25mmol/L MgCL₂ 1 μl， 2.5 m mol/L dNTP 2 μl， 5 U/ul Taq DNA Polymerase 0.3 μl， 10 μ mol/L 检测引物各 1 μl， 1ng~10ng/μl 模板 DNA 1μl， ddH₂O 16.2 μl；

SCAR-PCR 反应条件为 94℃ 1min; 94℃ 45second, 62℃ 45second, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 5min;

(3) SCAR-PCR 产物的检测结果：在电泳检测的 DNA 图谱中显示，扩增出的分子量为 414bp 的特异 DNA 条带，为猴头菇猴杰菌种的标志。

利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法

技术领域 本发明涉及一种微生物的鉴定方法，具体涉及利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法，属生物技术领域。

背景技术 猴头菇(*Hericium erinaceus*) 猴头菇是著名的八大山珍之一，与燕窝、鱼翅、海参并列为四大名肴。传统中医认为：猴头菇性平、味甘，有助消化、利五脏、润六肺的功能和补虚损的功效，能提高人体免疫能力，对慢性胃炎、十二指肠溃疡、胃溃疡等多种消化道疾病和神经衰弱均有较好疗效。猴头菇营养丰富，是一种高蛋白、低脂肪，富含人体必需的多种氨基酸、多肽、多糖和脂肪族的酰胺物质及多种维生素的优良保健食品。

我国食用菌资源丰富，品种比较多，近年来，由于菌种管理制度不健全，致使猴头菇菌种混乱，出现同名异物、同物异名的现象。大量的混淆不清的菌种名称不但使产业技术无从规范，也使我国近 10 年来几乎没有按食用菌育种技术规范选育出的优良品种。而大量使用的多数是十几年前选育的未经系统筛选和测试的组织分离物。这些非品种的菌种又常被冠以新名，而其区别性、一致性和稳定性无从知晓。这种混淆和混乱不仅给生产环节带来诸多不便，也对食用菌的科学研究与学术交流造成障碍。

猴头菇的人工栽培已逐渐形成较大规模，创造了较好的经济效益。优质的猴头菇菌种是获得高单产和高质量的前提与基础，这就决定了猴头菇菌种在猴头菇产业中的重要地位。因此为了保证每批次的用种都准确无误，减少不必要的损失，需要开发简便、快速、准确的菌株鉴定技术。

发明内容 本发明的目的是提供一种利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的快速检测方法。

本发明的利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法，包括菌丝培养与收集、基因组 DNA 的提取、SCAR-PCR 分子标记的检测建立和 SCAR-PCR 产物的检测；其特征在于

1、SCAR-PCR 分子标记的检测，使用的检测引物是猴杰 F/R，其中，猴杰 F 是 5'- CGCAACCAAAACAAAAACGACAATG -3'，猴杰 R 是 5'-

CGTTCCACCCCTACGTTTAGCCTCA -3';

2、SCAR-PCR 分子标记的检测建立: SCAR-PCR 扩增体系为 10×PCR buffer 2.5 μl, 25mmol/L MgCL₂ 1 μl, 2.5 mmol/L dNTP 2 μl, 5 U/μl Taq DNA Polymerase 0.3 μl, 10 μmol/L 检测引物各 1 μl, 1ng~10ng/μl 模板 DNA 1μl, ddH₂O 16.2 μl;

SCAR-PCR 反应条件为 94℃ 1min; 94℃ 45second, 62℃ 45second, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 5min;

3、SCAR-PCR 产物的检测结果: 在电泳检测的 DNA 图谱中显示, 扩增出的分子量为 414bp 的特异 DNA 条带, 为猴头菇猴杰菌种的标志。

本发明提供的利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种的方法, 具有灵敏度高, 所需要的 DNA 用量少, 与常规形态学检测、拮抗试验、出菇试验相比, 具有检测时间短、准确性高、容易判断、重复性好等优点。具体如下:

1、检测时间短: 该检测方法所需时间只需要 2—3 天, 而常规的拮抗试验所需时间至少需要两周时间, 常规形态学检测和出菇试验则需要至少 2 个月的时间。

2、准确性高、容易判断, 而且重复性好: 该检测方法以基因组 DNA 为材料, DNA 是稳定的遗传物质, 不易受外界因素等的影响, 同时它的 1012bp 或 371bp 的显性标记判断一目了然, 减少人为判断的偏差, 大大提高了准确性; 常规的拮抗试验中, 拮抗表现形式至少有 3 种, 甚至更多, 有时表现形式不明显, 还受培养环境的影响, 拮抗表现不仅在种内的不同品种之间会出现, 同时在种间的菌株之间也会表现出来, 给准确判断造成困难; 出菇试验更容易受到环境、时间等各方因素的影响, 重复性差, 加大了检测困难; 形态学检测在同一属种内的不同品种之间可区别的特征少, 有些甚至没有什么差异, 同时还需要判断者具有丰富的知识与经验, 方可做出准确的判断。

3、此外该方法得到的显性标记可减少猴头菇新品种认定的工作量, 检测时该方法只需要 1 个阳性菌株和 1 个阴性菌株对照便可快速比较, 而用常规形态学、拮抗试验、出菇试验方法来认定一个新品种, 需要将所有同种内的不同品种一起搬出来比较, 才能做出正确的认定, 这就要很大的人力和物力, 当品种多时可能使得认定工作无法进行。

本发明对猴头菇种质资源的利用和新品种的登记工作，提供了更为有效的菌种鉴定体系，以及加强对我国猴头菇种质资源的保护工作都具有重要意义。

附图说明 图1为使用引物猴杰F/R检测猴头菇菌种扩增的DNA图谱。其中M~17为泳道编号；左侧的数字表示DNA片段的分子量，箭头所指是猴杰菌株特异性标记。

具体实施方式 为了充分公开本发明的利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法，以下结合实施例加以说明。

实施例1：一种利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法

一种利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法，包括以下步骤：

一、菌丝培养与收集

（一）若供测试猴头菇菌株的保藏时间小于6个月，则菌丝培养按如下方法进行：

- 1、用接种耙耙碎含猴头菇菌丝的PDA培养基，转接入250 ml三角瓶，含100 ml PDA液体培养基中；
- 2、放置在25℃摇床上，转速90~130 r/min培养7~10 d；
- 3、用纱布过滤培养好的菌丝，蒸馏水冲洗，滤纸吸干；
- 4、称取0.5~1.3g菌丝，用滤纸包好，保存于-20℃备用。

（二）若供测试猴头菇菌株保藏时间不小于6个月，则菌丝培养采用如下方法：

- 1、取猴头菇菌种豆块大小转接到PDA斜面上，25℃培养7~10天；
- 2、用接种耙耙碎含猴头菇菌丝的PDA培养基，转接入250 ml三角瓶，含100 ml PDA液体培养基中；
- 3、放置在25℃摇床上，转速90~130 r/min培养7~10 d；
- 4、用纱布过滤培养好的菌丝，蒸馏水冲洗，滤纸吸干；
- 5、称取0.5~1.3g菌丝，用滤纸包好，保存于-20℃备用。

二、基因组DNA的提取，所述基因组DNA可以从菌株的菌丝体或子实体中提取。

- 1、取保存备用的猴头菇菌丝0.5~1.3g，或子实体0.5~1.3g，放入研钵，加入液氮迅速研磨成粉末，转入7ml的离心管；

- 2、加 2.5 mL 65℃预热的抽提液,同时加入 50 μ l 巯基乙醇,上下震荡,使蛋白质变性沉淀;
- 3、65℃水浴 1h,每隔 10min 振荡 1 次;
- 4、加入 2.5 ml 的氯仿异戊醇混匀,除去蛋白质;
- 5、8000 r/min,4℃离心 10min,取上清到 7ml 离心管;
- 6、加 1/5 体积 65℃预热的 CTAB/NaCl 混匀,加入 2.5 ml 的氯仿异戊醇混匀;
- 7、10000r/min, 4℃离心 10min,取上清;
- 8、加入 2.5 ml 65℃预热的 CTAB 沉淀液,颠倒混匀,65℃水浴 1h 至沉淀可见或可过夜;
- 9、12000r/min,4℃离心 10min 后,小心去除上清液;
- 10、用 0.5ml TE 溶液或无菌水溶解沉淀 10min;
- 11、加入 0.25ml 饱和酚和 0.25m L 氯仿异戊醇,混匀;
- 12、12000 r/min, 4℃离心 10min,取上清,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,混匀;
- 13、放置-20℃冰箱 1h 或过夜;
- 14、12000 r/min, 4℃离心 10 min,弃上清;
- 15、自然风干沉淀,用 30 μ l TE 溶液或无菌去离子水溶解沉淀, -20℃保存备用。

三、SCAR-PCR 分子标记的检测建立

SCAR-PCR 扩增体系: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 1 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ l, 5 U/ μ l Taq DNA Polymerase 0.3 μ l, 10 μ mol/L 专用检测引物猴杰 F/R 1 μ l, 1ng~10ng/ μ l 模板 DNA 1 μ l, ddH₂O 16.2 μ l。

SCAR-PCR 反应条件: 94℃ 1min; 94℃ 45second, 62℃ 45second, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 5min。

所述专用检测引物猴杰 F/R, 是采用 PCR 技术, 经过大量的筛选试验, 获得了猴头菇猴杰菌种的特异 DNA 片断, 以此片段的 DNA 序列为基础, 设计猴杰菌种的特异检测引物。所述专用检测引物猴杰 F/R 具体内容为: 猴杰 F 是 5'- CGCAACCAAAACAAAAACGACAATG -3', 猴杰 R 是 5'- CGTTCCACCCCTACGTTTAGCCTCA -3'。

四、PCR 扩增产物检测

具体检测方法为，取 PCR 扩增产物 8 μ l 加上 1.5 μ l 6 $\times$ 溴酚蓝上样缓冲液，混匀，在 1.0%琼脂糖凝胶，含 Goldview™DNA 染料进行电泳，5V/cm 恒压电泳 50 min，通过紫外凝胶成像系统观察并照像。或者，取 PCR 扩增产物 8 μ l，与 1.5 μ l 6 $\times$ 溴酚蓝上样缓冲液混匀，点样于 1%的琼脂糖凝胶上，于 0.5 X TBE 缓冲液中，5V/cm 恒压电泳 0.5~1h，电泳结束后，用 EB 染色，然后在凝胶成像仪上照相。

PCR 扩增产物检测结果采用检测引物猴杰 F/R 对猴头菇菌株进行 SCAR-PCR 扩增，只有猴杰菌株能扩增出分子量为 414bp 的 DNA 条带。

本发明所使用的主要试剂如下：（所有化学试剂均为分析纯）

- 1、CTAB 抽提液：100 mmol/L Tris-HCl， 2.0% CTAB，20 mmol/L EDTA，1.4 mol/L NaCl，pH 8.0；
- 2、CTAB 沉淀液：50 mmol/L Tris-HCl，1.0% CTAB，10 mmol/L EDTA，pH 8.0；
- 3、CTAB/NaCl：0.7 mol/L NaCl， 10% CTAB；
- 4、TE 缓冲液：10 mmol/L Tris HCl ，1 mmol/L EDTA；
- 5、0.5 $\times$ TBE：44.5 mmol/L Tris，50 mmol/L H₃BO₃、1 mmol/L EDTA；
- 6、上样缓冲液：0.1% 溴酚蓝, 40% 蔗糖；
- 7、EB：10 mg/ml 溴化乙锭；
- 8、PCR 扩增试剂购自大连宝生物公司。

本发明所使用的主要仪器如下：SW-CJ-1FB 型单人水平垂直两用净化工作台：苏州净化设备有限公司；

手提式灭菌锅：上海三申；

HYG-A 全温摇瓶柜：太仓市实验室；

冷冻离心机：Sigma 3K30；

PCR 扩增仪：Eppendorf AG22331 Hamburg；

掌型离心机：江苏海门市麒麟医用仪器厂 Lx-100 手掌型离心机；

凝胶成像系统：TANON-2008。

Untitled1.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> 福建农林大学

<120> 利用分子标记技术鉴定猴头菇猴杰菌种的方法

<130>

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 猴头菇

<400> 1

cgcaacccaaa acaaaaacga caatg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 猴头菇

<400> 2

cgttcacccc ctacgttttag cctca

25

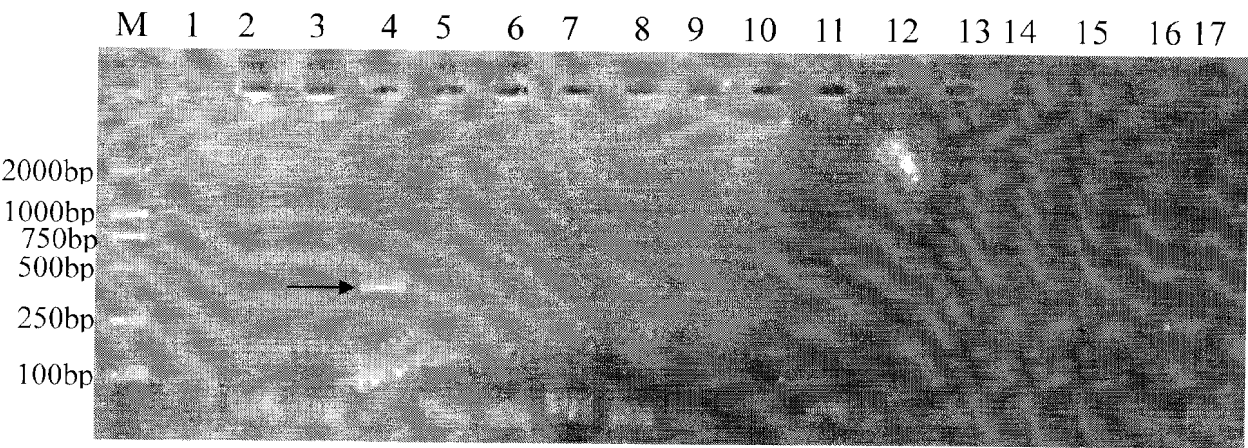


图 1