

[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 200810072136.8

[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 101402995A

[22] 申请日 2008.11.18

[21] 申请号 200810072136.8

[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 邓优锦 谢宝贵 江玉姬 刘新锐
温志强

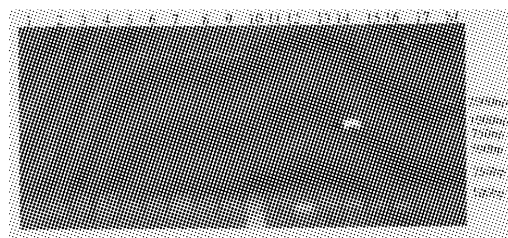
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法

[57] 摘要

利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王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。本发明使用 2 对不同的引物猴王 F1/R1 和猴王 F2/R2，对供测试的菌株进行 SCAR-PCR 分子标记的检测和 SCAR-PCR 产物的检测；当使用猴王 F1/R1 检测引物时，SCAR-PCR 产物的检测结果在 DNA 图谱中显示的分子量为 1012bp 的特异 DNA 条带，为猴头菇菌种猴王的标志；当使用猴王 F2/R2 检测引物时，SCAR-PCR 产物的检测结果在 DNA 图谱中显示的分子量为 371bp 的特异 DNA 条带，为猴头菇菌种猴王的标志。



1、一种利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法，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王 F1/R1，其中，猴王 F1 是 5'-CTCCTCCCTTCACAATAAATAGCCA-3'，猴王 R1 是 5'-TCCCTGAAGTTCTTTGTCTTCCCGT-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/ul 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 1012bp 的特异 DNA 条带，为猴头菇菌种猴王的标志。

2、一种利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法，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王 F2/R2，其中，猴王 F2 是 5'-CCCTCCACAACCACCACAAGATAAT-3'，猴王 R2 是 5'-CTCCTCGCCGTCTGCATAAGAACTC-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/ul 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，67℃ 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 371bp 的特异 DNA 条带，为猴头菇菌种猴王的标志。

利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法

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菌种猴王的方法，属生物技术领域。

背景技术 猴头菇(*Hericium erinaceus*) 肉嫩味美，营养丰富。很早以前，人们把它与熊掌、海参、鲨鱼翅并列为“四大名菜”，有“山珍猴头，海味燕窝”的美称，在古代被作为贡品。人体必需的9种氨基酸，猴头菇都含有。据报道，猴头菇所含有的营养成分与目前人工栽培的其它食用菌品种相比都居第一、二位，因而显得更加珍贵。

我国食用菌资源丰富，品种比较多，但是由于部分生产者有意或无意的改名，造成猴头菇的栽培菌种存在“异种同名或同种异名”的混乱现象。这种现象极大地损害了育种者和生产者的利益，不但给科学研究和学术交流带来障碍，而且对规范生产和产品质量标准的制定带来很大困难。

优质菌种在猴头菇单产和质量中的贡献举足轻重，这决定了猴头菇菌种在猴头菇产业中的重要地位。随着大规模的工厂化栽培方式的出现，对猴头菇栽培菌株质量的要求越来越高，需要更为简便、快速、准确的菌株鉴定技术，以保证每批次的用种都准确无误。

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菌种猴王的快速检测方法。

本发明的利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法有2种，2种鉴定方法都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；

方法一的特征在于

1、SCAR-PCR分子标记的检测，使用的检测引物是猴王F1/R1，其中，猴王F1是5'-CTCCTCCCTTCACAATAAATAGCCA-3'，猴王R1是5'-TCCCTGAACTTCTTTGTCTTCCCGT-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/ul Taq

DNA Polymerase 0.3 μl , 10 $\mu\text{mol/L}$ 检测引物各 1 μl , 1ng~10ng/ μl 模板 DNA 1 μl , 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 1012bp 的特异 DNA 条带, 为猴头菇菌种猴王的标志。

方法二的特征在于:

1、SCAR-PCR 分子标记的检测, 使用的检测引物是猴王 F2/R2, 其中, 猴王 F2 是 5'-CCCTCCACAACCACCACAAGATAAT-3', 猴王 R2 是 5'-CTCCTCGCCGTCTGCATAAGAACTC-3';

2、SCAR-PCR 分子标记的检测建立: SCAR-PCR 扩增体系为 10 $\times$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 检测引物各 1 μl , 1ng~10ng/ μl 模板 DNA 1 μl , ddH₂O 16.2 μl ;

SCAR-PCR 反应条件为 94℃ 1min; 94℃ 45second, 67℃ 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 371bp 的特异 DNA 条带, 为猴头菇菌种猴王的标志。

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为采用第一种方法检测猴头菇菌种扩增的DNA图谱。其中1~M为泳道编号；右侧的数字表示DNA片段的分子量，箭头所指是猴王菌株特异性标记。

图2为采用第二种方法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，箭头所指是猴王菌株特异性标记。

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菌种猴王的方法，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菌种猴王的方法

一种利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法，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 μl TE 溶液或无菌去离子水溶解沉淀， -20°C 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 μl ，25mmol/L MgCl_2 1 μl ，2.5 mmol/L dNTP 2 μl ，5 U/ μl Taq DNA Polymerase 0.3 μl ，10 $\mu\text{mol/L}$ 专用检测引物猴王 F1/R1 1 μl ，1ng $\sim$ 10ng/ μl 模板 DNA 1 μl ，ddH₂O 16.2 μl 。

SCAR-PCR 反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 1min；94 $^{\circ}\text{C}$ 45second，62 $^{\circ}\text{C}$ 45second，72 $^{\circ}\text{C}$ 1min，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 5min。

所述专用检测引物猴王 F1/R1，是采用 PCR 技术，经过大量的筛选试验，获得了猴头菇菌种猴王的特异 DNA 片断，以此片段的 DNA 序列为基础，设计猴王菌种的特异检测引物。所述专用检测引物猴王 F1/R1 具体内容为：猴王 F1 是 5'-CTCCTCCCTTCACAATAAATAGCCA-3'，猴王 R1 是 5'-TCCCTGAACTTCTTTGTCTTCCCGT-3'。

四、PCR 扩增产物检测

具体检测方法为，取 PCR 扩增产物 8 μl 加上 1.5 μl 6 $\times$ 溴酚蓝上样缓冲液，混匀，在 1.0%琼脂糖凝胶，含 GoldviewTM 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 μl ，与 1.5 μl 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 $\sim$ 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，如图 1 所示，采用检测引物猴王 F1/R1 对猴头菇菌株进行 SCAR-PCR 扩增，只有猴王菌株能扩增出分子量为 1012bp 的 DNA 条带。

实施例 2：一种利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法

一种利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法，包括以下步骤：

一、菌丝培养与收集，具体方法与实施例 1 的步骤一相同；

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；具体方法与实施例 1 的步骤二相同；

三、SCAR-PCR 分子标记的检测建立，其中，SCAR-PCR 扩增体系与实施例 1 步骤三的扩增体系相同；SCAR-PCR 反应条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 1min；

94℃ 45second, 67℃ 45second, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 5min。

所述专用检测引物猴王 F2/R2, 是采用 PCR 技术, 经过大量的筛选试验, 获得了猴头菇菌种猴王的特异 DNA 片断, 以此片段的 DNA 序列为基础, 设计猴王菌种的特异检测引物。所述专用检测引物猴王 F2/R2 具体内容为: 猴王 F2 是 5'-CCCTCCACAACCACCACAAGATAAT-3', 猴王 R2 是 5'-CTCCTCGCCGTCTGCATAAGAACTC-3'。

四、PCR 扩增产物检测, 具体方法与实施例 1 步骤四的具体检测方法相同。PCR 扩增产物检测结果, 如图 2 所示, 采用检测引物猴王 F2/R2 对猴头菇菌株进行 SCAR-PCR 扩增, 只有猴王菌株能扩增出分子量为 371bp 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×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。

序列表
SEQUENCE LISTING

<110> 福建农林大学

<120> 利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴王的方法

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 猴头菇

<400> 1

ctcctccctt cacaataaat agcca

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 猴头菇

<400> 2

tccctgaact tctttgtctt cccgt

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 猴头菇

<400> 3

ccctccacaa ccaccacaag ataat

25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> 猴头菇

<400> 4

ctcctcgccg tctgcataag aactc

25



图 1

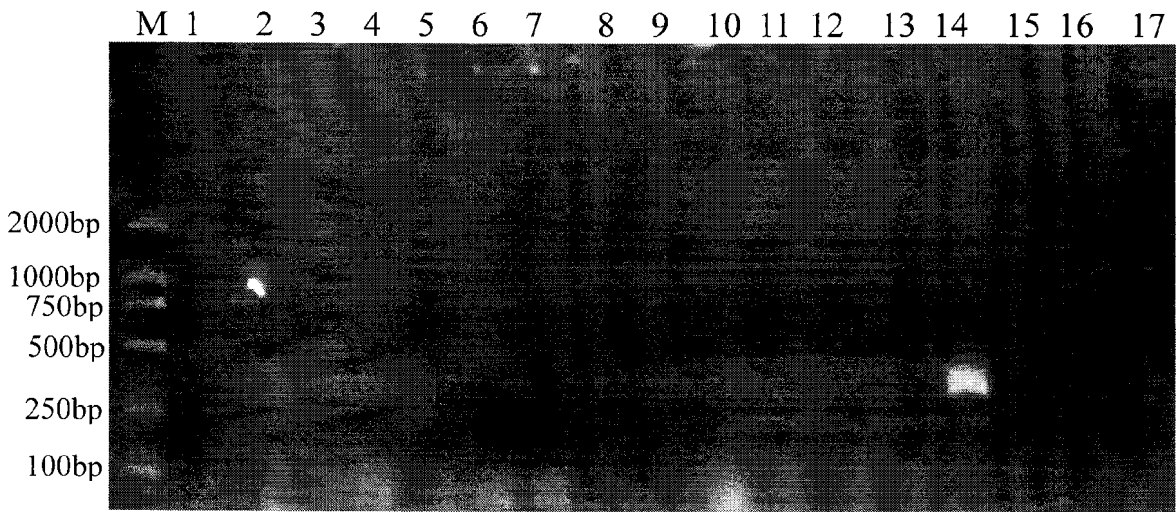


图 2