



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105567842 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201610080428. 0

(22) 申请日 2016. 02. 05

(71) 申请人 杭州市农业科学研究院

地址 310024 浙江省杭州市西湖区转塘镇杭
新路东 1 号

(72) 发明人 周祖法 陆娜 宋吉玲

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限
公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/04(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

C12R 1/645(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

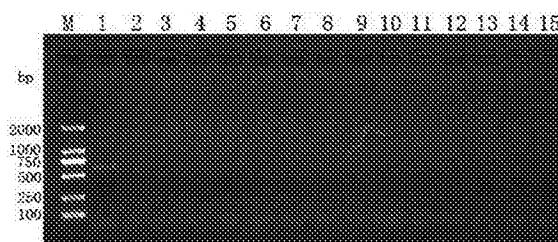
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

鉴定猴头菇猴杰 2 号的引物对及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种鉴定猴头菇猴杰 2 号的引物对及方法。所述引物对包括上游引物和下游引物, 上游引物为: 5' -CAAACCGGTGTCAGGGAAGTGC-3', 下游引物为: 5' -ACGAATTTGAATCCTCCACGTCGAA-3'。本发明引物对根据猴头菇猴杰 2 号特异性分子标记设计得到, 利用该引物对通过 PCR 法来鉴定猴头菇猴杰 2 号, 具有检测时间短、准确性高、容易判断、重复性好等优点, 且可以进行快速的早期鉴别。



1. 引物对,包括上游引物和下游引物,其特征在于,
上游引物为:5'-CAAACCGGTGTCAGGGAAGTGC-3',
下游引物为:5'-ACGAATTTGAATCCTCCACGTCGAA-3'。
2. 如权利要求1所述引物对在鉴定猴头菇猴杰2号中的应用。
3. 如权利要求1所述引物对在制备鉴定猴头菇猴杰2号的试剂盒中的应用。
4. 一种利用如权利要求1所述的引物对鉴定猴头菇猴杰2号的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1)DNA提取,
- (2)PCR扩增,
- (3)电泳检测,

若电泳检测结果出现597bp大小的DNA条带,则待测猴头菇品种为猴头菇猴杰2号,反之则否。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述的PCR扩增反应体系为:

2×Power Taq PCR Master Mix	10 μL
10 μM 上游引物	1.5 μL
10 μM 下游引物	1.5 μL
20 ng/μL 模板 DNA	3 μL
ddH ₂ O	4 μL。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述的PCR扩增条件为:
94℃预变性7min;94℃变性45min,58.5℃退火45s,72℃延伸2min,共30个循环;72℃延伸7min;4℃保温。

7. 猴头菇猴杰2号特异性DNA片段,其特征在于,碱基序列如SEQ ID No.1所示。

8. 如权利要求7所述的猴头菇猴杰2号特异性DNA片段作为分子标记在鉴定猴头菇猴杰2号中的应用。

鉴定猴头菇猴杰2号的引物对及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子鉴定技术领域,特别是涉及一种鉴定猴头菇猴杰2号的引物对及方法。

背景技术

[0002] 猴头菇(*Hericium erinaceus*),又叫猴头菌,只因外形酷似猴头而得名。猴蘑,猴头,猴菇,是中国传统的名贵菜肴,肉嫩、味香、鲜美可口。猴头菇是一种食药兼用的珍稀菌类,其子实体和发酵菌丝均可入药。随着人民生活水平的提高,猴头菇也进入了普通家庭,特别是“非典”以后,猴头菇的营养及药用价值更加被认识,猴头菇市场消费急增,广阔的市场需求使人工栽培迅速发展。

[0003] 随着猴头菇产业的快速发展,对高产、抗逆的猴头菇种质资源需求愈加迫切。但由于猴头菇品种本身具有无性繁殖的遗传特性,使得在菌种市场上同种异名,异种同名、假种、劣种现象普遍存在,再加上菌种质量的退化现象,不仅极大地损害了猴头菇生产者和育种者的利益,也影响了猴头菇产业的持续健康发展。因此,建立起一套科学可靠、快速便捷的猴头菇品种鉴定体系至关重要。而我国目前对猴头菇品种质量的监督管理,主要依靠在生产层面制定的各项生产技术标准,而在菌种质量技术层面尚未取得关键性突破,特别是缺乏猴头菇良种的早期快速鉴别技术体系。

[0004] 就全国范围内来看,目前猴头菇主栽品种为15个,包括猴杰2号、猴头菇99、猴头菇G2M5.496、猴头菇G2M5.497、猴头菇920、猴头菇911、猴头菇99-1、猴头菇H6、猴王、大猴头、猴头6号、常山猴头菇、猴头BJ-5、福建猴头菇、猴头菇19号。对这些猴头菇品种的鉴别主要依据猴头菇菌丝、菌落和子实体形态的宏观观察、生长特性、生理生化反应以及不同菌株间发生的拮抗反应等,但由于这些方法易受环境因素和生理状况的影响,并且随着品种数量不断增多,使得品种鉴定愈来愈困难。

[0005] 自本世纪以来,一些基于PCR的分子标记技术如RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)、ISSR(Inter-Simple Sequence Repeat,简单序列重复区间扩增多态性)和SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism,相关序列扩增多态性)相继用于猴头菇的种质资源遗传多样性、遗传距离研究,但对于分子标记与猴头菇性状的连锁、猴头菇品种间的分子鉴别研究很少。况且,这些分子标记技术所采用的均为通用引物,其PCR扩增图谱不仅复杂、重复性差,而且特异性不高,因此并不适合用于品种鉴别,只有开发出某个品种稳定、特异的DNA指纹标记才能真正用于该猴头菇品种的准确快速鉴定。

[0006] CN101985657A公开了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。使用此发明公开的分子特异性引物猴王F2/R2检测引物进行PCR扩增,猴头菇菌种猴王的特征扩增产物为371bp。CN101402994A公开了一种利用分子标记技术鉴定猴头菇菌种猴杰的方法,具体步骤与CN101985657A中类似,使用此发明公开的分子特异性引物进行PCR扩增,

猴头菇菌种猴杰的特征扩增产物为414bp。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种鉴定猴头菇猴杰2号的引物对,该引物对特异性高,利用PCR法进行鉴定操作方便,结果准确。

[0008] 引物对,包括上游引物和下游引物:

[0009] 上游引物为:5'-CAAACCGGTGTCAGGGAAGTGC-3',

[0010] 下游引物为:5'-ACGAATTTGAATCCTCCACGTCGAA-3'。

[0011] 利用序列相关扩增多态性(Sequence-related Amplified Polymorphism,SRAP)分子标记技术对猴头菇主栽品种的分子鉴别进行探索性研究。提取各猴头菇品种的菌丝基因组DNA作为模板,用大量SRAP随机引物对进行PCR扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,最后筛选得到具有差异条带(仅猴头菇猴杰2号有而其余品种没有)的引物一对。将该差异条带进行切胶回收,然后连接到克隆载体上送去测序,所得DNA片段大小为597bp,其碱基序列如SEQ ID No.1所示,该DNA片段为猴杰2号的特异性DNA片段。由该猴杰2号的特异性DNA片段设计得到所述引物对。

[0012] 以猴头菇基因组DNA为模板,利用所述引物进行PCR扩增,仅猴杰2号可稳定获得597bp大小的特异性DNA片段,而其他猴头菇品种均不能获得该特异性DNA片段。

[0013] 本发明又提供了所述引物对在鉴定猴头菇猴杰2号中的应用。

[0014] 本发明还提供了所述引物对在制备鉴定猴头菇猴杰2号的试剂盒中的应用。所述试剂盒包括所述引物对、DNA提取试剂,PCR所用的聚合酶、缓冲液、dNTP等相关试剂。

[0015] 本发明还提供了所述引物鉴定猴头菇猴杰2号的方法,包括以下步骤:

[0016] (1)DNA提取,

[0017] (2)PCR扩增,

[0018] (3)电泳检测,

[0019] 若电泳检测结果出现597bp大小的DNA条带,则待测猴头菇品种为猴头菇猴杰2号,反之则否。

[0020] 本发明方法关键在于扩增引物的选择,至于DNA提取、PCR反应体系和反应条件,以及电泳检测,均可按照本领域常规方法进行。

[0021] 优选的,本发明所述PCR反应体系组成如下:

	2×Power Taq PCR Master Mix	10 μL
	10 μM 上游引物	1.5 μL
[0022]	10 μM 下游引物	1.5 μL
	20 ng/μL 模板 DNA	3 μL
	ddH ₂ O	4 μL。

[0023] 其中2×Power Taq PCR Master Mix购自北京百泰克生物技术有限公司。

[0024] 所述的PCR扩增条件为:94℃预变性7min;94℃变性45min,58.5℃退火45s,72℃延伸2min,共30个循环;72℃延伸7min;4℃保温。

[0025] 利用所述引物对扩增猴头菇猴杰2号获得的597bp的DNA片段可以作为猴头菇猴杰

2号分子标记,碱基序列如SEQ ID No.1所示。

[0026] 本发明还提供了所述猴头菇猴杰2号特异性DNA片段作为分子标记在鉴定猴头菇猴杰2号中的应用。

[0027] 当然,在所述猴头菇猴杰2号特异性DNA片段的基础上,对所述引物对进行个别碱基的增加或减少,经PCR扩增试验也是只有猴杰2号能稳定获得特异性片段的,也可以用于鉴定猴杰2号。

[0028] 本发明引物对根据猴头菇猴杰2号特异性分子标记设计得到,利用该引物对通过PCR法来鉴定猴头菇猴杰2号,具有检测时间短、准确性高、容易判断、重复性好等优点,且可以进行快速的早期鉴别。

附图说明

[0029] 图1为利用本发明的分子标记引物对对猴头菇猴杰2号与其他猴头菇品种进行PCR扩增结果电泳图,其中1为猴头菇猴杰2号,2~15为其它的猴头菇品种,M为DL2000DNA Marker。

具体实施方式

[0030] 实施例1

[0031] 利用SRAP分子标记技术对15种猴头菇主栽品种的分子鉴别进行探索性研究。提取各猴头菇品种的菌丝基因组DNA作为模板,用大量SRAP随机引物对进行PCR扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,最后筛选得到具有差异条带(仅猴头菇猴杰2号有而其余品种没有)的引物一对。将该差异条带进行切胶回收,然后连接到克隆载体上送去测序,所得DNA片段大小为597bp,其碱基序列如SEQ ID No.1所示,该DNA片段为猴杰2号的特异性DNA片段。

[0032] 针对所得猴杰2号的特异性DNA片段设计引物对,引物对的序列为:

[0033] 上游引物:5'-CAAACCGGTGTCAGGGAAGTGC-3'

[0034] 下游引物:5'-ACGAATTTGAATCCTCCACGTCGAA-3',

[0035] 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

[0036] 以15种主栽品种猴头菇的基因组DNA为模板,利用所述引物对进行PCR扩增,仅猴杰2号可稳定获得597bp大小的特异性DNA片段,而其他猴头菇品种均不能获得该特异性DNA片段。

[0037] 实施例2

[0038] (1)猴头菇良种基因组DNA的提取

[0039] 取待测猴头菇菌丝体0.03g,加液氮彻底磨碎,利用新型快速植物基因组DNA提取试剂盒(DP3111,BioTeke,北京百泰克生物技术有限公司)提取基因组DNA,获得猴头菇良种的基因组DNA粗提物。使用琼脂糖凝胶电泳和DNA/RNA紫外分光光度计(Nanodrop Technologies,USA)检测所得基因组DNA粗提物的完整性、纯度及浓度。 $OD_{260}/OD_{280}>1.8$ 的DNA样品用于后续PCR扩增。DNA提取物于-20℃冰箱贮藏备用。

[0040] (2)PCR扩增

[0041] PCR反应液组成:2×Power Taq PCR Master Mix 10μL,10μM上下游特异引物对各1.5μL,20ng/μL模板DNA3μL,ddH₂O 4μL。

[0042] 扩增反应在Life ECO型扩增仪(Bioer,杭州博日科技有限公司)上进行。扩增条件:94℃预变性7min;94℃变性45min,58.5℃退火45s,72℃延伸2min,共30个循环;72℃延伸7min;4℃保温。

[0043] (3)琼脂糖凝胶电泳跑胶检测

[0044] 取步骤(2)PCR扩增产物5μL,与1μL 0.25%溴酚兰缓冲液混匀,点样于1.5%的琼脂糖凝胶上样孔,于1×TAE缓冲液中,5V/cm电压下跑电泳。电泳结束后,在含0.5μg/mL EB的水溶液中染色30分钟,然后使用美国伯乐自动凝胶图像分析仪(Chemi Doc XRS imaging system,Bio-Rad,Hercules,CA,USA)进行观察和照相。

[0045] 按照上述方法,分别对表一中所示15个猴头菇良种进行检测鉴定,结果见图1。

[0046] 表1猴头菇良种编号及名称。

[0047]	编号	猴头菇良种
	1	猴杰 2 号
	2	猴头菇 99
	3	猴头菇 G2M5.496
	4	猴头菇 G2M5.497
	5	猴头菇 920

[0048]	6	猴头菇 911
	7	猴头菇 99-1
	8	猴头菇 H6
	9	猴王
	10	大猴头
	11	猴头 6 号
	12	常山猴头菇
	13	猴头 BJ-5
	14	福建猴头菇
	15	猴头菇 19 号

[0049] 如图1所示,编号为1的猴杰2号中扩增出了一条清晰明亮、分子量大小为597bp的特异DNA条带,而其余编号的猴头菇良种,未见有大小597bp的特殊DNA条带产生,也未有其它非目的条带产生,可见本发明开发出的分子特异性标记用于猴杰2号的鉴别,其稳定性、特异性非常高。

SEQUENCE LISTING

<110> 杭州市农业科学研究院

<120> 鉴定猴头菇猴杰 2 号的引物对及方法

<130>

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 597

<212> DNA

<213> 猴头菇 (Hericium erinaceus) 猴杰 2 号

<400> 1

[0001]

```

caaaccggtg tcagggaact gcgaaccgca tagtgagtaa agacaaacct gatcgacgat      60
gcaatcagcg tgtctggata tgcggatgcc gtgaacagta tctatcaagc cgactcatta      120
gtaccagctg cctatacaga taaaatttatt tgcataaccgc tgcaaattcg tatectcttg      180
cgttccaggt cgataggaag tgcgagaggt agaggcecca taactgattt cggetgagaa      240
ccacagtttc cgaatcttca ggttcggggt cgacggtcga aatcaacggc gcggttgact      300
cgatgagctc caattccaga agtgaactctt cagaggtcct gatctacggt acctcaagtg      360
gatgggaagt gtctaggat caggatcgat cagtgaaccgc ttggacgctc ggtgtgagac      420
cttcggagac ggcgaactac tccgcgccag gccctgaag ctagactaca tgcatacgt      480
gctctgtgca gcctagcgtt gtcttcaagt tccaatacaa gactgtcgat ggcccggcga      540
ttgatcagat caatgttttg agcaaagate atttcgaagt ggaggattca aattcgt      597

```

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

caaaccggtg tcagggaact gc

22

	<210>	3	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
[0002]	<213>	人工序列	
	<400>	3	
	acgaattga atctccacg tcgaa		25



图1