



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104195262 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410491821. X

(22) 申请日 2014. 09. 24

(71) 申请人 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

地址 300461 天津市滨海新区保税区京门大道 158 号

(72) 发明人 胡佳续 郭京泽 刘鹏 王金成
罗加凤 廖芳 黄国明

(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1页 附图1页

(54) 发明名称

拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物及其设计方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物及其设计方法和应用。本发明设计的是针对拟茎点霉属真菌的通用引物。其上游引物 PhR1-F 有 43 个碱基 :CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC TGCAGCAAGGTGTTGGCTG, 下游引物 PhR1-R 有 43 个碱基 :AGCGGATAACAATTCACACAGGAGCGATGTCGTTG TCCATGTA。本发明设计的拟茎点霉 RNA 聚合酶基因扩增引物可以快速的对拟茎点霉属真菌进行大规模的遗传背景分析,为我国拟茎点霉的种类鉴定、地理种群鉴别或检验检疫工作提供了重要的工具。

1. 拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物,其特征是将测序序列和扩增序列结合在一起,是一对针对拟茎点霉属真菌的通用引物,其上游引物 PhR1-F 有 43 个碱基 :CGCCAGGG TTTTCCCAGTCACGACTGCAGCAAGGTGTTGGCTG ;下游引物 PhR1-R 有 43 个碱基 :AGCGGATAACAATT TCACACAGGAGCGATGTCGTTGTCCATGTA。

2. 权利要求 1 所述扩增引物的设计方法,其特征包括如下步骤:

找出已测定全序列的 60 种拟茎点霉 RPB1 基因,去掉不完全和部分序列,进行同源性比较,寻找保守序列,选取扩增序列,并在 5' 端加入测序序列,从而获得一对通用引物。

3. 权利要求 1 中所述拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物在种类鉴定、地理种群鉴别或口岸检验检疫中的应用。

拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物及其设计方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及拟茎点霉真菌鉴别技术领域,具体的说,涉及拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物及其设计方法和应用。

背景技术

[0002] 拟茎点霉属(Phomopsis (Sacc.) Bubak) 是半知菌亚门(Deuteromycotina)、腔孢纲(Coelomycetes)、球壳孢目(Sphaeropsidales)、球壳孢科(Sphaeropsidaceae)中的重要真菌属,其有性态为间座壳属(Diaporthe),含有 400 多个不同的种、呈世界性分布,主要集中在热带和亚热带地区。拟茎点霉属真菌是农业和林业上重要的病原菌,寄主植物共 74 科,可引起多种植物病害,例如溃疡、烂茎、果腐、叶枯、枝枯、根腐、树皮坏死等。此外,该属的部分种类还是植物的重要内生菌和腐生菌,甚至可以危害人或其他哺乳动物,在生态系统中占有重要的地位。

[0003] RNA 聚合酶(DNA-dependent RNA polymerases) 在基因表达的过程中扮演着很重要的角色。早在 1984 年以前,生物化学家就已经在真核生物中成功地分离出 3 种 RNA 聚合酶。其中, RNA 聚合酶 II 由 12 个亚基组成(RPB1-RPB12),负责转录生成 hnRNA 和 mRNA。RPB1(the largest RNA polymerase subunit) 基因负责编码 RNA 聚合酶 II 的大亚基,具有单拷贝和进化速率慢的特点。

[0004] RPB1 基因片段与其他基因片段如 ITS (internal transcribed spacer)、RPB2、EF(elong ation factor) 等相结合,目前已广泛地应用于真菌的分类和系统发育研究。RPB1 基因适用于亲缘关系较近、外形相似的真菌间的分析比较,在拟茎点霉真菌种类鉴定、地理种群鉴别或口岸检验检疫中具有重要应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一对可高效扩增拟茎点霉 RPB1 基因的扩增引物。

[0006] 本发明的另一个目的是提供上述引物的设计方法。

[0007] 本发明的进一步目的是提供上述引物在拟茎点霉种类鉴定、地理种群鉴别和检验检疫中的应用。

[0008] 本发明设计的拟茎点霉 RPB1 基因扩增引物其上游引物 PhR1-F 有 43 个碱基 :CGC CAGGGTTTTCCAGTCACGACTGCAGCAAGGTGTTGGCTG,下游引物 PhR1-R 有 43 个碱基 :AGCGATAACAATTTACACAGGAGCGATGTTCGTTGTCCATGTA。

[0009] 本发明的拟茎点霉 RPB1 基因扩增引物设计的步骤为 :登陆 GenBank 搜索目前已测定全序列的 60 种拟茎点霉 RPB1 基因,去掉不完全和部分的序列,寻找保守序列,设计出扩增序列,并在 5' 端加入测序序列,从而获得一对通用引物 :其上游引物 PhR1-F 有 43 个碱基 :CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACTGCAGCAAGGTGTTGGCTG,下游引物 PhR1-R 有 43 个碱基 :AGCGATAACAATTTACACAGGAGCGATGTTCGTTGTCCATGTA。扩增片断大小在 750bp 左右。

[0010] 可扩增拟茎点霉属真菌 RPB1 基因的通用引物 PCR 反应体系和反应条件如下：

PCR 反应体系为 25 μ L, 内含 2 \times Taq MasterMix、10 μ M 的引物 PhR1-F 和引物 PhR1-R、含 50 ~ 150ng 的 DNA 模板溶液、ddH₂O。

[0011] 2 \times Taq MasterMix 12.5 μ L

PhR1-F 1 μ L

PhR1-R 1 μ L

Template 1 μ L

ddH₂O 9.5 μ L

扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 共 35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。

[0012] 本发明所述的拟茎点霉 RPB1 基因扩增引物能扩增拟茎点霉 RPB1 基因, 均能获得单一的目的 DNA 片段, 产物大小为 750bp 左右, 并对所有 PCR 扩增产物进行直接测序。其步骤为：PCR 扩增产物经初步定量后, 浓度达 100ng/ μ l 的样品委托公司进行双向直接测序, 测序引物为 M13F-47 (10 μ M) 和 RV-M (10 μ M), 序列分析仪为 ABI 3730 型全自动 DNA 测序仪。

[0013] 与现有技术相比, 本发明具有如下有益效果：

本发明的拟茎点霉 RPB1 基因扩增引物对部分拟茎点霉 RPB1 基因进行扩增, 均能获得单一的目的 DNA 片段, 特异性扩增产物大小为 750bp 左右, 经测序及与 GenBank 上同源序列的比较, 证实为拟茎点霉 RPB1 基因的扩增产物。本发明设计的拟茎点霉 RPB1 基因扩增引物可以快速地对多种拟茎点霉进行大规模的遗传背景分析, 准确鉴定某些难于鉴别的近缘物种, 为我国拟茎点霉种类鉴定、地理种群鉴别或检验检疫工作提供了重要的工具。

附图说明

[0014] 图 1、图 2 均为 PhR1-F/PhR1-R 扩增不同拟茎点霉 RPB1 基因的电泳图谱。

[0015] 其中 M:DNA 分子量标准 (100bp DNA Ladder), N:阴性对照, H₂O:水对照, 1 - 27:依次为扁桃拟茎点霉 (*Phomopsis amygdaliana*)、梨干枯拟茎点霉 (*Phomopsis fukushii*)、大豆拟茎点种腐病菌 (*Phomopsis longicolla*)、苹果拟茎点菌 (*Phomopsis mali*)、芒果拟茎点霉 (*Phomopsis mangiferae*)、叶下珠生拟茎点霉 (*Phomopsis phyllanthicola*)、柿苗拟茎点霉 (*Phomopsis rojana*)、茶渍病拟茎点霉 (*Phomopsis theae*)、茎生拟茎点霉 (*Phomopsis truncicola* Miura)、石榴干腐菌 (*Phomopsis versoniana*)、葡萄生拟茎点霉菌 (*Phomopsis viticola*)、芦笋拟茎点霉 (*Phomopsis asparagi*)、粽竹拟茎点霉 (*Phomopsis rhapsidis*)、茄褐纹拟茎点霉 (*Phomopsis vexans*)、樟拟茎点霉 (*Phomopsis cinnamom*)、蔓绿绒拟茎点霉 (*Phomopsis philodendri*)、花烛拟茎点霉 (*Phomopsis anthurii*)、黄瓜黑色根腐病菌 (*Phomopsis sclerotioides*)、栗拟茎点霉 (*Phomopsis castanea*)、柿拟茎点霉 (*Phomopsis diospyr*)、茴香拟茎点霉 (*Phomopsis foeniculi*)、十字花拟茎点霉 (*Phomopsis cruciferae*)、杏拟茎点霉 (*Phomopsis amygdali*)、苘麻拟茎点霉 (*Phomopsis abutilonis*)、仙人掌拟茎点霉 (*Phomopsis cacti*)、橡胶拟茎点霉 (*Phomopsis heveae*)、小麦拟茎点霉 (*Phomopsis controversa*)。

具体实施方式

[0016] 登陆 GenBank 搜索目前已测定线粒体 DNA 全序列的 60 种拟茎点霉 RPB1 基因, 去掉不完全和部分的序列, 寻找保守序列, 设计出扩增序列, 并在 5' 端加入测序序列, 从而获得一对针对拟茎点霉属真菌 RPB1 基因的通用引物; 其上游引物 PhR1-F 有 43 个碱基: CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACTGCAGCAAGGTGTTGGCTG, 下游引物 PhR1-R 有 43 个碱基: AGCGGATAACAATTTACACAGGAGCGATGTCGTTGCCATGTA。扩增片断大小在 750bp 左右。

[0017] 可扩增拟茎点霉属真菌 RPB1 基因的通用引物 PCR 反应体系和反应条件如下:

PCR 反应体系为 25 μ L, 内含 2 \times Taq MasterMix、10 μ M 的引物 PhR1-F 和引物 PhR1-R、含 50 ~ 150ng 的 DNA 模板溶液、ddH₂O。

[0018] 2 \times Taq MasterMix 12.5 μ L

PhR1-F 1 μ L

PhR1-R 1 μ L

Template 1 μ L

ddH₂O 9.5 μ L

扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60s, 共 35 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。

[0019] 本发明所述的拟茎点霉 RPB1 基因引物能扩增拟茎点霉 RPB1 基因, 均能获得单一的目的 DNA 片段, 产物大小为 750bp 左右, 并对所有 PCR 扩增产物进行直接测序。其步骤为: PCR 扩增产物经初步定量后, 浓度达 100ng/ μ l 的样品委托公司进行双向直接测序, 测序引物为 M13F-47 (10 μ M) 和 RV-M (10 μ M), 序列分析仪为 ABI 3730 型全自动 DNA 测序仪。

[0020] 本发明的拟茎点霉 RPB1 基因扩增引物对部分拟茎点霉 RPB1 基因进行扩增, 均能获得单一的目的 DNA 片断, 特异性扩增产物大小为 750bp 左右, 经测序及与 GenBank 上同源序列的比较, 证实为包含拟茎点霉 RPB1 基因的扩增产物。其主要扩增的拟茎点霉真菌包括以下种类:

扁桃拟茎点霉 (*Phomopsis amygdaliana*)、梨干枯拟茎点霉 (*Phomopsis fukushii*)、大豆拟茎点种腐病菌 (*Phomopsis longicolla*)、苹果拟茎点菌 (*Phomopsis mali*)、芒果拟茎点霉 (*Phomopsis mangiferae*)、叶下珠生拟茎点霉 (*Phomopsis phyllanthicola*)、柿苗拟茎点霉 (*Phomopsis rojana*)、茶渍病拟茎点霉 (*Phomopsis theae*)、茎生拟茎点霉 (*Phomopsis truncicola* Miura)、石榴干腐菌 (*Phomopsis versoniana*)、葡萄生拟茎点霉菌 (*Phomopsis viticola*)、芦笋拟茎点霉 (*Phomopsis asparagi*)、粽竹拟茎点霉 (*Phomopsis rhapsidis*)、茄褐纹拟茎点霉 (*Phomopsis vexans*)、樟拟茎点霉 (*Phomopsis cinnamom*)、蔓绿绒拟茎点霉 (*Phomopsis philodendri*)、花烛拟茎点霉 (*Phomopsis anthurii*)、黄瓜黑色根腐病菌 (*Phomopsis sclerotioides*)、栗拟茎点霉 (*Phomopsis castanea*)、柿拟茎点霉 (*Phomopsis diospyr*)、茴香拟茎点霉 (*Phomopsis foeniculi*)、十字花拟茎点霉 (*Phomopsis cruciferae*)、杏拟茎点霉 (*Phomopsis amygdali*)、苘麻拟茎点霉 (*Phomopsis abutilonis*)、仙人掌拟茎点霉 (*Phomopsis cacti*)、橡胶拟茎点霉 (*Phomopsis heveae*)、小

麦拟茎点霉(*Phomopsis controversa*)。其电泳图谱如图 1、图 2 所示,从而可对拟茎点霉真菌进行分析鉴别。

SEQUENCE LISTING

- <110> 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心
- <120> 拟茎点霉 RNA 聚合酶 (RPB1) 基因扩增引物及其设计方法和应用
- <130> 201409
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 43
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 1
- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC TGC AGC AAG GTG TTG GCT G 43
- <210> 2
- <211> 44
- <212> DNA
- <213> 人工合成
- <400> 2
- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA GCG ATG TCG TTG TCC ATG TA 44

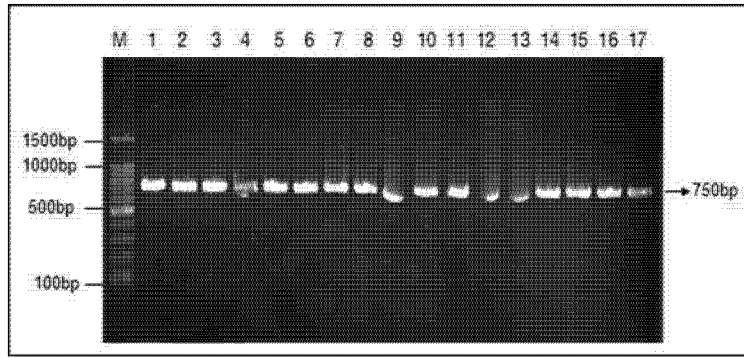


图 1

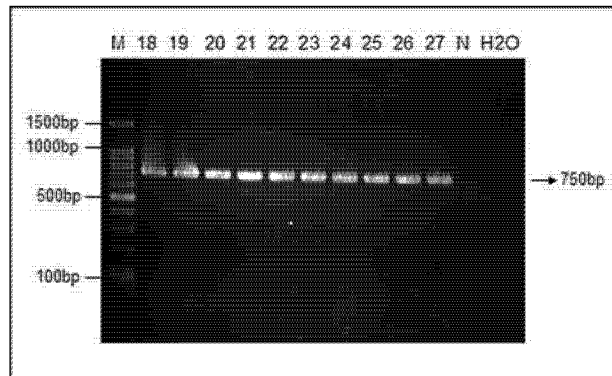


图 2