



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108588258 B

(45) 授权公告日 2021.07.23

(21) 申请号 201810397676.7
 (22) 申请日 2018.04.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 108588258 A
 (43) 申请公布日 2018.09.28
 (73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所
 地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号
 (72) 发明人 杨志云 杨俊波 伊廷双 何俊
 杨静 贺正山
 (74) 专利代理机构 北京化育知识产权代理有限公司 11833
 代理人 尹均利
 (51) Int. Cl.
 C12Q 1/6895 (2018.01)
 C12Q 1/6869 (2018.01)

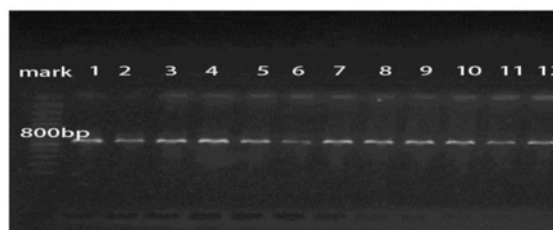
(56) 对比文件
 CN 105861711 A, 2016.08.17
 CN 104673930 A, 2015.06.03
 CN 107630014 A, 2018.01.26
 张爽等. 罂粟属植物核心DNA条形码的筛选. 《中国中药杂志》. 2015, 第40卷(第15期), 第2964-2969页.
 张哲等. 基于DNA条形码技术对新疆罂粟科部分植物系统发生分析. 《干旱区研究》. 2014, 第31卷(第2期), 第322-328页.
 Jianguo Zhou等. Complete Chloroplast Genomes of Papaver rhoeas and Papaver orientale: Molecular Structures, Comparative Analysis, and Phylogenetic Analysis. 《Molecules》. 2018, 第23卷(第2期), 第1-15页.
 审查员 万青

权利要求书1页 说明书7页
 序列表2页 附图4页

(54) 发明名称
 罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法

(57) 摘要

本发明提供一种基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟(鸦片)的鉴定方法。该方法通过广泛调查罂粟属植物的分布区,采集到多个地点的样品,构建该属植物的叶绿体序列的数据库,通过比对发现了罂粟特有的信息位点,在总长1994bp的三个序列中,P1引物(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2引物(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3引物(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。利用上述位点与其他物种的差异即可快速准确地鉴定出罂粟。



1. 罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法,使用罂粟属植物的叶绿体基因来检测罂粟,并找到罂粟的特有碱基作为它与罂粟属植物的序列差异的信息位点,由这些特征信息位点来区分罂粟属中与罂粟相似的植物,所述的罂粟的叶绿体DNA条形码基因序列由DNA条形码引物序列扩增得到,如P1、P2和P3三个片段所示,在总长1994bp的三个序列中,P1长467bp:第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2长816bp:第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3长711bp:第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A;

所述DNA条形码引物序列为P1F:GGTTCAAATCCTATTGGACGCA,P1R:GGATCTGCGGCGCAAATTAA;P2F:TCAAATTTTCAATGGGAAGAAATTCT,P2R:TCGATTCTTCCTTCAACTTGGGA;P3F:TTCCATCCCCAGACTGTCA,P3R:AGGTCAAGAAAGGCCAACCA。

2. 罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法,其特征在于该方法主要包括下述步骤:(1)提取待测样本DNA;(2)利用DNA条形码引物进行PCR扩增,得到扩增产物,所述的DNA条形码引物序列为P1F:GGTTCAAATCCTATTGGACGCA,P1R:GGATCTGCGGCGCAAATTAA;P2F:TCAAATTTTCAATGGGAAGAAATTCT,P2R:TCGATTCTTCCTTCAACTTGGGA;P3F:TTCCATCCCCAGACTGTCA,P3R:AGGTCAAGAAAGGCCAACCA;(3)对所述扩增产物进行测序,按照下列特异性位点进行罂粟植物的物种鉴定,罂粟的特征位点为:总长1994bp的三个序列中,P1长467bp:第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2长816bp:第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3长711bp:第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A;(4)对待测的疑似罂粟物种的扩增产物进行测序,如果符合上述(3)所列条件,则该待测样本为罂粟;如果不符合上述(3)的条件,则该待测样本不是罂粟。

3. 根据权利要求2所述的罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法,其特征在于所述PCR的扩增体系为25 μ L,体系包含MgCl₂ 2.0 μ L,dNTP 2.0 μ L,PCR缓冲液2.5 μ L,ddH₂O 13 μ L,引物各1.0 μ L,exTaq酶1.5U,总DNA 2.0 μ L;所述PCR的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C变性4min,1个循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,54 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,进行30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

4. 根据权利要求2所述的罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法,其特征在于,所述测序为双向测序,所述的测序序列为P1、P2和P3三个片段所示;所述测序的反应体系为5 μ L:其中ddH₂O 3 μ L,10 μ mol/L测序引物0.5 μ L,测序反应混合物0.5 μ L,PCR纯化产物1 μ L;所述测序的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性10s;94 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火5s,60 $^{\circ}$ C延伸4min,进行30个循环。

5. 一种基于大数据的罂粟DNA条形码,其特征在于所述的罂粟DNA条形码基因序列由DNA条形码引物序列扩增得到序列P1、P2和P3三个片段,总长1994bp的三个序列中,P1长467bp,其中第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2长816bp,其中第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3长711bp,其中第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A;

所述DNA条形码引物序列为P1F:GGTTCAAATCCTATTGGACGCA,P1R:GGATCTGCGGCGCAAATTAA;P2F:TCAAATTTTCAATGGGAAGAAATTCT,P2R:TCGATTCTTCCTTCAACTTGGGA;P3F:TTCCATCCCCAGACTGTCA,P3R:AGGTCAAGAAAGGCCAACCA。

罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子鉴定技术领域,具体涉及一种叶绿体DNA分子条形码的鉴定方法,对罂粟(*Papaver somniferum*)进行DNA条形码测序及分子鉴定。

背景技术

[0002] 罂粟(*Papaver somniferum*)俗称鸦片、大烟,是罂粟科(*Papaveraceae*)罂粟属(*Papaver*)植物。早在六朝时期罂粟就已从欧洲传入我国,最初仅作为观赏花卉和药用植物来栽培,深受人们喜爱。历朝历代本草书中常用名有阿芙蓉、鸦片、阿片、罂子粟、米囊、大烟等。其入药部位主要用种子、罂粟壳以及从罂粟壳中割取的生鸦片和经再加工的熟鸦片。而西方早期就以罂粟为原料制作鸦片,可用于治疗各种动物咬伤所致的中毒症状。到了晚清年间,鸦片已发展成为危害世间的毒品,大量人吸食鸦片后,出现发冷、虚汗、乏力、面黄肌瘦,重着上瘾,使人慢性中毒。给人民的身体健康带来损害,给社会造成了不可估量的损失。

[0003] 罂粟属在我国有7个种:罂粟(*Papaver somniferum*)、虞美人(*P. rhoeas*)、黑环罂粟(*P. pavoninum*)、长莢罂粟(*P. dubium*)、野罂粟(*P. nudicaule*)、灰毛罂粟(*P. canescens*)和长白山罂粟(*P. radicum*)。该属其它植物并没有上瘾、毒害人体的作用,仅作为园艺花卉来栽培种植,特别是虞美人因花大,花色艳丽、花期长而被世人喜爱。但又因虞美人与罂粟形态特征较为相似,而常常无法分辨,造成了不必要的恐慌与误会。给国家和人民带来了极大的损失和浪费。

[0004] DNA条形码是应用有足够变异的标准化短基因片段对物种进行快速、准确鉴定的新的生物身份识别系统。其要求被测物种的序列变异较大,能将亲缘关系较近的物种以及新发生的物种彼此区分开来。*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*、*trnLF*和ITS为现在通用的DNA条形码基因。但这些基因片段,并不一定是最适合于每个物种的鉴定的片段。在本发明的这个属中,通过对该属一些物种的叶绿体基因组比对,本发明找到了该属植物的变异更大的区域,特别是罂粟植物在该区域变异位点较多,能更好的区分该属植物,因此设计了引物来区分罂粟与该属的其它植物。可作为该属植物的特有DNA条形码。

发明内容

[0005] 有鉴于此,为了克服现有技术存在的上述缺点,本发明的目的在于提供一种较为明确、快速、可靠的基于罂粟属植物DNA条形码,并利用该DNA条形码鉴定罂粟(鸦片)的方法,来提高鉴定结果的可靠性和准确性。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,使用罂粟属植物的叶绿体基因来检测罂粟,并找到罂粟的特有碱基作为它与罂粟属植物的序列差异的信息位点,由这些特征信息位点来区分罂粟属中与罂粟相似的植物。

[0008] 根据所述的基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,其中所述的罂粟的叶绿体DNA条形码基因总长1994bp的三个序列中,P1(长467bp):第26bp为A,第32-

37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。根据所述的基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,其中所述DNA条形码的序列如P1、P2和P3三个片段所示。

[0009] 本发明同时提供了一种基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,该方法主要包括下述步骤:

[0010] (1) 提取待测样本DNA;

[0011] (2) 利用DNA条形码引物进行PCR扩增,得到扩增产物,所述的DNA条形码引物序列为P1F:GGTTCAAATCCTATTGGACGCA,P1R:GGATCTGCGGCGCAAATTAA;

[0012] P2F:TCAAATTTTCAATGGGAAGAAATTCT,P2R:TCGATTCTTCTTCAACTTGA;

[0013] P3F:TTCCATCCCCCAGACTGTCA,P3R:AGGTCAAGAAAGCCAACCA;

[0014] (3) 对所述扩增产物进行测序,按照下列特异性位点进行罂粟植物的物种鉴定,罂粟的特征位点为:总长1994bp的三个序列中,P1(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。

[0015] (4) 对待测的疑似罂粟物种的扩增产物进行测序,如果符合上述(3)所列条件,则该待测样本为罂粟;如果不符合上述(3)的条件,则该待测样本不是罂粟。

[0016] 根据所述的基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,其中所述PCR的扩增体系为25 μ L,体系包含MgCl₂2.0 μ L,dNTP 2.0 μ L,PCR缓冲液2.5 μ L,ddH₂O 13 μ L,引物各1.0 μ L,exTaq酶1.5U,总DNA 2.0 μ L;所述PCR的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C变性4min,1个循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,54 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,进行30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0017] 根据所述的基于植物叶绿体基因DNA对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,其中所述测序为双向测序,所述的测序序列为P1、P2和P3三个片段所示;所述测序的反应体系为5 μ L:其中ddH₂O 3 μ L,10 μ mol/L测序引物0.5 μ L,测序反应混合物0.5 μ L,PCR纯化产物1 μ L;所述测序的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性10s;94 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火5s,60 $^{\circ}$ C延伸4min,进行30个循环。

[0018] 本发明同时还提供了一种基于大数据的罂粟DNA条形码,所述的罂粟DNA条形码为由序列P1、P2和P3三个片段,得到的总长1994bp的三个序列中,P1(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0020] 本发明通过对中国分布的罂粟属植物进行采样,并采用了多个个体,构建了中国分布的罂粟属植物叶绿体DNA条形码大数据库,然后通过比较发现罂粟属植物叶绿体DNA条形码序列特有信息位点,进一步获得其特有的DNA条形码。

[0021] 本发明使用分子DNA条形码的方法来鉴定中国分布的罂粟属植物中罂粟特有的信息位点,通过对P1、P2和P3三个片段进行PCR扩增和测序,直接获得鉴定结果,检测过程快速,结果准确性高,该方法大大有利于缉毒工作的快速、有效鉴定鸦片(罂粟)。

附图说明

[0022] 图1为罂粟属部分植物样品的PCR扩增产物图谱,其中,右“1”为GeneRuler100bp Plus DNA Ladder;

[0023] 图2-1至2-3为罂粟属植物的部分样品比对序列结果,其中图2-1为部分罂粟属植物的P1序列;其中图2-2为部分罂粟属植物的P2序列;其中图2-3为部分罂粟属植物的P3序列。

具体实施方式

[0024] 下面结合附图,用本发明的实施例来进一步说明本发明的实质性内容,但并不以此来限定本发明。

[0025] 实施例1

[0026] 本发明通过对中国分布的罂粟属植物广泛取样,尽可能增加个体数,构建该属植物的叶绿体DNA条形码数据库,通过比较发现罂粟(鸦片)的DNA条形码特有信息位点,进一步获得其特有的DNA条形码。

[0027] 本发明的罂粟DNA条形码是由P1、P2和P3三个片段扩增得到的总长1994bp的三个序列,其中P1(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。

[0028] 本发明的扩增引物采用的是自己设计的DNA条形码引物,扩增得到的1996bp的序列中有15个特异性识别位点,根据上述特异性位点的碱基种类即可鉴定罂粟(鸦片)。

[0029] 本发明的罂粟DNA条形码是基于该属在中国分布的所有种的DNA分子序列测序得到的,考虑到同一个属中的不同种存在个体间变异较小的情况,是一种基于大数据的罂粟DNA条形码。采用本发明的上述罂粟DNA条形码能够快速、准确的对罂粟进行鉴定,克服传统分类鉴定中出现的可靠性差的缺陷。

[0030] 本发明通过对待测样本的DNA进行提取,通过对扩增产物进行测序,将扩增产物的序列与本发明罂粟DNA条形码中的特异性识别位点进行比较,直接获得鉴定结果。该检测过程快速,准确性高,可用于罂粟(鸦片)的快速鉴定。

[0031] 本发明中,待测样本的DNA提取方法采用本领域中技术人员所熟知的方法。在本发明具体实施时,采用了改良2×CTAB法提取待测样本的总DNA。本发明对待测样本中DNA来源没有特殊要求,可以用待测样本的叶子、根、茎。

[0032] 本发明中的PCR扩增及扩增引物进行测序时所用的序列均为自己设计序列,具体为:

[0033] P1F:GGTTCAAATCCTATTGGACGCA

[0034] P1R:GGATCTGCGGCGCAAATTAA

[0035] P2F:TCAAATTTTCAATGGGAAGAAATTCT

[0036] P2R:TCGATTCTTCCTTCAACTTGGA

[0037] P3F:TTCCATCCCCAGACTGTCA

[0038] P3R:AGGTCAAGAAAGGCCAACCA

[0039] 本发明中,PCR扩增方法及对扩增产物进行测序的方法采用本领域技术人员所熟

知的方法即可。

[0040] 本发明优选采用25 μ L的PCR扩增体系,体系配比如下:体系包含MgCl₂

[0041] 2.0 μ L,dNTP 2.0 μ L,PCR缓冲液2.5 μ L,ddH₂O 13 μ L,引物各1.0 μ L,exTaq酶1.5U,总DNA 2.0 μ L;本发明对扩增体系中的试剂来源没有特殊的限定,扩增体系中所用的试剂均可采用本领域技术人员所熟知的商用试剂。

[0042] PCR的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2min,1个循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,49 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸2min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min。上述扩增体系及扩增条件下所有的备选样品DNA均能扩增出使用的序列。本领域技术人员可以在上述技术方案的基础上对扩增体系条件进行适当合理的调整。如改变扩增体系的体积、体系组成成分的浓度、调整扩增的温度及时间等条件,均属于本发明的保护范围。本发明优选对扩增产物进行纯化。采用本领域技术人员所熟知的纯化方法进行即可。若P1引物扩增得到467bp、P2得到816bp、和P3得到711bp的产物,则待测样本通过测序比对特异性识别位点可确定是否为罂粟(鸦片)。

[0043] 本发明对测序的方式没有特殊的限定,采用本领域技术人员所熟知的测序方法,使用单向测序或双向测序均可。本发明在具体的实施过程中,以严谨的态度,采取了双向测序的方法。

[0044] 本发明中优选采用PCR的扩增体系为用5 μ L的测序反应体系:ddH₂O 3 μ L,10 μ mol/L测序引物0.5 μ L,测序反应混合物0.5 μ L,PCR纯化产物1 μ L。实验过程中所使用的试剂均可采用本领域中所熟知的商用试剂。测序的反应条件优选为:96 $^{\circ}$ C预变性10s,50 $^{\circ}$ C退火5s,60 $^{\circ}$ C延伸4min,33个循环。本领域技术人员可以在上述技术方案的基础上对测序反应体系条件进行适当合理的调整,如改变反应体系的体积、组分的浓度、测序的时间和温度等条件,均属于本发明的保护范围。反应完成后,将产物进行沉降、纯化、热变性后,上机进行测序。本发明对沉降、纯化、热变性及测序过程没有特殊限定,采用本技术领域人员所熟知的方法。

[0045] 将测序结果与本发明的罂粟DNA条形码进行比对,若满足下列条件则待测样本为罂粟(鸦片):总长1994bp的三个序列中,P1(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。

[0046] 本发明采用通用引物及本领域技术人员均能操作的PCR扩增和测序方法即可对其进行快速鉴定,鉴定的过程省时、快速、准确性较高。

[0047] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,下面结合更具体的实施例子对本发明进行详细的说明,但是不能把它们理解为本发明保护范围的限定。

[0048] 实施例2:

[0049] 1. 罂粟属植物的标本采集和保护:

[0050] 查阅文献和国内的标本馆的馆藏信息,根据DNA条形码的采样要求制定采样的方案,每个物种尽可能的采集其分布区内不同来源的个体,所有个体的叶片用硅胶干燥保存。罂粟属植物7个种,总的个体数为40个(含变种)个体的叶片材料。其中,罂粟(鸦片)的样品来自新疆伊犁野外野生零星生长于树林边,每个地点各采集3份叶片样品。材料清单和样品来源见表1。

[0051] 表1罂粟属植物标本及来源

[0052]

样品编号	种名 (中文名)	种名 (拉丁名)	样品来源
1	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
2	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
3	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
4	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
5	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
6	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
7	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
8	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
9	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
10	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
11	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
12	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
13	灰毛罂粟	<i>Papaver canescens</i> Tolm.	新疆伊犁
14	长莢罂粟	<i>Papaver dubium</i> L.	新疆伊犁
15	长莢罂粟	<i>Papaver dubium</i> L.	新疆伊犁
16	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	陕西宝鸡
17	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
18	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
19	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
20	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
21	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
22	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
23	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
24	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
25	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
26	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁

[0053]

27	黑环罂粟	<i>Papaver pavoninum</i> Fisch.	新疆伊犁
28	黑环罂粟	<i>Papaver pavoninum</i> Fisch.	新疆伊犁
29	黑环罂粟	<i>Papaver pavoninum</i> Fisch.	新疆伊犁
30	长白山罂粟	<i>Papaver radicum</i> Rottb. var. <i>pseudo-radicatum</i> (Kitag.) Kitag.	吉林省延边州
31	长白山罂粟	<i>Papaver radicum</i> Rottb. var. <i>pseudo-radicatum</i> (Kitag.) Kitag.	吉林省白山市
32	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	新疆伊犁
33	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
34	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
35	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
36	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
37	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
38	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
39	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
40	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明

[0054] 2. 总DNA提取

[0055] 利用改良的2×CTAB法提取上述罂粟属植物叶片的总DNA,具体步骤如下:

[0056] (1) 使用干净的研钵、杵子高压灭菌、烘干、冷却;

[0057] (2) 取用干净的叶片放入研钵中,用液氮冷却材料,待材料僵硬变脆后,用力研磨材料使之细如粉末,然后将研磨好的材料转移到预冷的2ml的离心管中;

[0058] (3) 在2ml的离心管中加入1ml预热的2×CTAB提取液和2μLβ-巯基乙醇(2%V/V),将材料完全放入提取液中,并充分混匀。放入65℃水浴锅中温浴约1.5小时,期间摇匀4-6次;

[0059] (4) 将温浴材料取出后,加入等体积的氯仿异戊醇(体积比24:1)溶液,摇匀5-10分钟,然后以10000-12000转/分钟离心5分钟;

[0060] (5) 将上清液(约700~800 μ L)转移到一新的离心管中(注意在吸取过程中避开杂质);

[0061] (6) 重复步骤(4)、(5)两次;

[0062] (7) 将上清液(约450~600 μ L)转移到新的离心管中加入70%体积的异戊醇,沉降DNA,轻轻颠倒2~3次,可见白色絮状沉淀,4 $^{\circ}$ C冰箱中静置30分钟以上,然后12000转离心5~10分钟,弃上清;

[0063] (8) 用200 μ L的76%的乙醇和无水乙醇各洗2次,然后12000转离心5~10分钟,弃上清液。将离心管放入37 $^{\circ}$ C烘箱中(或室温下)干燥,待乙醇挥发后,加入30~50 μ L TE溶液和1~2 μ L RNase A,并放入37 $^{\circ}$ C的烘箱中用核糖核酸酶(RNase A)消化2~3小时,最后放入-20 $^{\circ}$ C的冰箱中备用。

[0064] 3. PCR扩增反应

[0065] DNA浓度用紫外分光光度计(UV-VIS spectrophotometer(TU-1800))检测,最后稀释到50~100ng/ μ L备用。

[0066] 采用下列引物扩增核糖体DNA序列:

[0067] P1F:GGTTCAAATCCTATTGGACGCA

[0068] P1R:GGATCTGCGGCGCAAATTAA

[0069] P2F:TCAAAATTTTCAATGGGAAGAAATTCT

[0070] P2R:TCGATTCTTCTTCAACTTGA

[0071] P3F:TTCCATCCCCCAGACTGTCA

[0072] P3R:AGGTCAAGAAAGGCCAACCA

[0073] PCR反应扩增体系,体系配比如下:体系包含MgCl₂2.0 μ L,dNTP 2.0 μ L,PCR缓冲液2.5 μ L,ddH₂O 13 μ L,引物各1.0 μ L,exTaq酶1.5U,总DNA 2.0 μ L。

[0074] 在以下扩增条件下所有备筛选的引物均能成功扩增:94 $^{\circ}$ C预变性2min,1个循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,49 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸2min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0075] 对扩增产物进行纯化,方法按试剂盒(上海生工Sangon)说明操作。使用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,结果证明,本发明扩增条件下所有备筛选的罂粟属样本引物均能成功扩增。部分样品电泳图谱参见图1。

[0076] 4. 扩增产物测序

[0077] 测序反应试剂使用ABI公司的PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit,双向测序。

[0078] 测序反应体系为5 μ L:其中ddH₂O 3 μ L,测序引物0.5 μ L(10 μ mol/L),测序反应混合物(mix,Big Dye v3.1)0.5 μ L,PCR纯化产物1 μ L。

[0079] 测序的序列使用步骤3中扩增序列,即P1、P2和P3。

[0080] 测序反应条件为:96 $^{\circ}$ C预变性10s,50 $^{\circ}$ C退火5s,60 $^{\circ}$ C延伸4min,33个循环;结束后加20 μ L沉降剂(无水乙醇:3M醋酸钠=20:1),4 $^{\circ}$ C沉降过夜。

[0081] 沉降产物经70%酒精纯化后加20 μ L ddH₂O在95 $^{\circ}$ C条件下变性2分钟后上样,在ABI3730自动测序仪上测序。

[0082] 5. 数据分析

[0083] 运用Sequencher4.1.4和BioEdit(ver 7.0.0)对测序结果分别进行拼接和比对,矩阵中的插入缺失用“-”代替(本发明没有使用插入、缺失的变异)。构建罂粟属植物的叶绿体DNA条形码的矩阵,获得DNA条形码数据库。

[0084] 6. 序列比对及罂粟的序列特征

[0085] 序列比对的结果为:整个矩阵总长为1994bp,本发明获得120条DNA序列,序列分属罂粟属7个种(含变种)40个个体。在矩阵中的罂粟所有样品的叶绿体DNA条形码信息识别位点为:P1(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。

[0086] 如果只看单个物种的序列,所有不同来源的罂粟扩增序列一致,用P1、P2和P3的引物扩增得到的序列产物信息位点完全一致。

[0087] 根据本发明所获得罂粟的特异信息位点可以作为罂粟的DNA条形码用于罂粟的鉴定。本发明的鉴定方法仅利用一般的通用性引物,通过PCR扩增和测序方法,通过上述15个特异性识别位点即可对罂粟进行快速鉴定。

[0088] 实施例3

[0089] 以药材种植区和野外所采集的无花无果的罂粟和其他罂粟属植株叶片为材料,采用实施例1的方法进行DNA提取,PCR扩增和测序,鉴定结果显示,在已知的罂粟植物所获得DNA条形码序列的P1(长467bp):第26bp为A,第32-37bp为GATTTA,第306bp为A;P2(长816bp):第50bp为C,第85bp为A,第136bp为A,第582bp为T,第743bp为A;P3(长711bp):第13-14bp为TA,第208bp为T,第240bp为C,第420bp为T,第519bp为A,第584bp为C,第613bp为A。而其他未知的罂粟属植物未见上述特异性位点,由此可以鉴定出罂粟样品。

[0090] 本发明的序列表为本发明一条罂粟(*Papaver somniferum*)个体的P1、P2和P3序列,其中在P2序列里与其它种的比较有29个碱基缺失,在P3序列里有7个碱基缺失。

[0091] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国科学院昆明植物研究所
- [0003] <120> 罂粟DNA条形码测序及分子鉴定方法
- [0004] <141> 2018-04-28
- [0005] <160> 3
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 476
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 罂粟(*Papaver somniferum* L.) (2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*)
- [0011] <400> 1
- [0012] aavrsmnrmt gaatgattta aataagaaac gtttatcgac gatttagatt tactaagagt 60
- [0013] aatcaacttc tttatgcttg ttctgaagt agaaaccgtt ccatctgttc cttaatagct 120
- [0014] tccttcaaaa gaacttctgc ttctccgga aatttcttgg tagaagatat gatttcttgc 180
- [0015] aattgaggtt tattcgtttt taagtaagta cgtaattgaa cgaggaattt ctttacctga 240
- [0016] tctatttcta acgaatcaag atacccattc gttccagtat aaatagtcac tacctgttct 300
- [0017] tccacggtga gaggagccga ttgggcttgt ttgagcaatt cacgtaatcg ttgacctctt 360
- [0018] gccaatgat tctgagttgc tttatcgaga tcagaagcaa attgtgcaaa ggcttctaac 420
- [0019] tctgcgaatt gagccagctc caattttaat ttgccagcta cttgtttcat ggcttt 476
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 796
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 罂粟(*Papaver somniferum* L.) (2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*)
- [0024] <400> 2
- [0025] aavrsmnrmg atttcttttt atatttataa tttatatgaa tatgattatc aatatcttca 60
- [0026] ttctaaatta ttagaaatta agaaaaaata tggaattcta aaaaaagaat cgaacgttca 120
- [0027] agtattttaa atcgggtagg aaaagtgcga ggaagagagg aatatatatg tggatatatat 180
- [0028] ccatccatat tgaattgcgg atacatcaat gatagaatca tttctgatta aaccaaagt 240
- [0029] aggtccttca atatagaaaa aggggtaaat aagaaagaaa taaaagaaat caaaggagga 300
- [0030] gtaaagagat aaacttttta gatagataag ctgtatctaa tgaattcaac ggtaacggt 360
- [0031] tccagcataa acgaaagaaa gaaggggatg gcatcccagc gagatcttcg gctcaaaacta 420
- [0032] aaaaggggat atggcgaaat cggtagacgc tacggacttg attgaattga gccttggtat 480
- [0033] ggaaacctac taagtataa ctttcaaatt cagagaaacc ctggaattaa aaatgggcaa 540
- [0034] tcctgagcca aatcctgttt tcagaaaaaa attaaggtat ttctgaaagc gagaataaaa 600
- [0035] aaaggatagg tgcagagact caatggaagc tgttctaata aatggagttg actgcgttgg 660
- [0036] tagaggactc cttctattca atttgaattt aaactccata aagaatgagg gataaaccta 720

[0037] cgatacgtaa gtatacgtac tgaatatca aagattctat taatgtcgcc ctaaaatttt 780
 [0038] tttacataaa aaaaag 796
 [0039] <210> 3
 [0040] <211> 714
 [0041] <212> DNA
 [0042] <213> 罂粟(Papaver somniferum L.) (2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)
 [0043] <400> 3
 [0044] aavrsmnrma gaattttcct ttattcccct tggattttta tgatgagatc gtttcttaga 60
 [0045] actgttccaa ggtttcggat agaaaggata taggatcttt atctgaatac cctctgttaa 120
 [0046] ccaatttttt ggaaattcca tttcggataa ttgaacacca ttataggtgc atttaacatg 180
 [0047] catttctcta cccactctc tccaatcctc attccattcc gggggttgaa ataataagat 240
 [0048] acggctgacg tttttagcta ttatcaatga aggcaatcca atatattttc taaaaatcga 300
 [0049] gtgggctatt aacaagcaac cccttattga ttgaccaa atagaacagtat ccagctttc 360
 [0050] cgctactgct agccggtcat tttctcccc tttcttcttc ctttttttat ctttttcttt 420
 [0051] tgtctcttcc tcaaaactgg aattttttta ttccgtactt tttatcatcc aattcttaaa 480
 [0052] aagaagattc caaattcggg aggtatcagc agaaaaaaaa aactttttgt agattctgtc 540
 [0053] caaaaaaagg ggggaatgga tatttgtttg aaacggttcc caaatacctg ttttacgtct 600
 [0054] ttgagcgcgc atagaacctt tgattatata tcgacgaaaa tccgattctt gcgcataacg 660
 [0055] taggacaaac acttcttcta cttcatcatt agtattcggt gtactatttg tacg 714

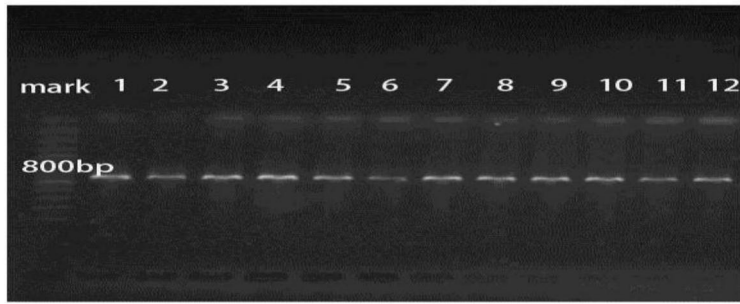


图1

Papaver_canescens	TGAATTATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC		AATTTCCCTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_nudicaule	TGAATTATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC		AATTTCCCTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_radicatum	TGAATTATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC		AATTTCCCTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_dubium	TTACTTATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC		GATTTACTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_rhoeas	TGACTTATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC		GATTTACTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_pavoninum	TGAATGATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC		GATTTCCCTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_somniferum	TGAATGATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC	GATTTA	GATTTACTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_somniferum	TGAATGATTTAAATAAGAAACGTTTC	CGAC	GATTTA	GATTTACTAAGAGTAATCAACTT
Papaver_canescens	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_nudicaule	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_radicatum	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_dubium	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_rhoeas	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_pavoninum	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_somniferum	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_somniferum	CITTTATGCTTGTTCCCTGAAGTAGAAA	CCGTTCCATCTGTTCCCTTAATAGCTT	CCTTCAA	
Papaver_canescens	AGGACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TGGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_nudicaule	AGGACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TGGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_radicatum	AGGACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TGGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_dubium	AGAACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TAGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_rhoeas	AGAACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TAGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_pavoninum	AGGACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TGGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_somniferum	AGAACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TGGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_somniferum	AGAACTTCTGCTTCCCTCGGAAATTTCT	TGGTAGAAGATATGATTTCTTGCAGTT	GAGGT	
Papaver_canescens	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_nudicaule	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_radicatum	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_dubium	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_rhoeas	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_pavoninum	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_somniferum	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_somniferum	TTATTCGTTTTAAGTAAAGTACGTAATT	GAACGAGGAATTTCTTTACCTGATCG	ATTTCT	
Papaver_canescens	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCGG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_nudicaule	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCGG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_radicatum	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCGG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_dubium	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCAG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_rhoeas	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCAG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_pavoninum	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCGG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_somniferum	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCAG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_somniferum	AACGAATCAAGATACCCATTCGTTCCAG	TATAAATAGTCATTACCTGTTCTTCCAC	GGTG	
Papaver_canescens	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_nudicaule	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_radicatum	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_dubium	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_rhoeas	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_pavoninum	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_somniferum	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_somniferum	AGAGGGCCGATTGGGCTTGTTT	GAGCAATTCACGTAATCGTTGACCTCTT	GCCAATTGA	
Papaver_canescens	TTTTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_nudicaule	TTTTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_radicatum	TTTTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_dubium	TTCTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_rhoeas	TTCTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_pavoninum	TTCTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_somniferum	TTCTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_somniferum	TTCTGAGTTGCTTTATCGAGATCAGAAG	CAAATTTGTCAAAGGCTTCTAACTCTG	CGAAT	
Papaver_canescens	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_nudicaule	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_radicatum	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_dubium	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_rhoeas	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_pavoninum	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_somniferum	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		
Papaver_somniferum	TGAGCCAGCTCCAATTTTAAATTTGCC	AGCTACTTGTTTCATGGCTTT		

图2-1

