



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108754007 B

(45) 授权公告日 2021.03.19

(21) 申请号 201810557683.9

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2018.06.01

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108754007 A

HATICE等. Development of EST-SSR markers for diversity and breeding studies in opium poppy.《Plant Breeding》.2013,第132卷摘要,表5.

(43) 申请公布日 2018.11.06

宋炳轲等. 利用DNA ITS2 条形码序列鉴定植物大麻和罂粟.《中国法医学杂志》.2015,第30卷(第2期),全文.

(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

朱典等. 利用种属特异性SSR 荧光引物检出稀释液中罂粟DNA 1 例.《中国法医学杂志》.2016,第31卷(第6期),全文.

(72) 发明人 杨志云 杨俊波 伊廷双 蔡杰
张志荣 袁文斌

审查员 张锦广

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务所(普通合伙) 53108

代理人 旃习涵

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

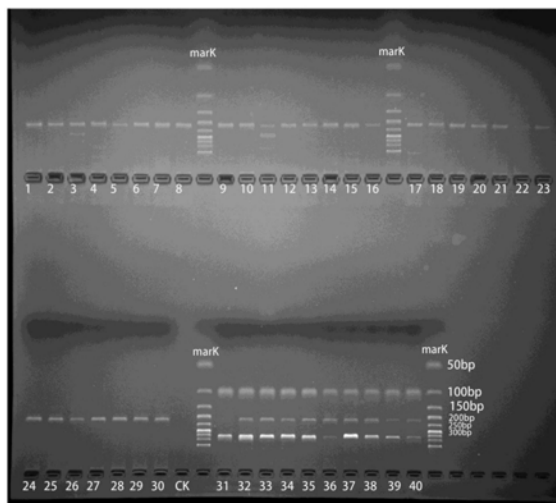
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法

(57) 摘要

本发明提供一种通过使用SSR技术快速鉴别罂粟原植物的方法,该方法包括以下步骤:(1)根据目的基因序列设计特异性的引物;(2)使用设计的引物对罂粟属的植物DNA进行PCR扩增;(3)PCR扩增产物使用4%琼脂糖电泳;(4)使用花青素染色;(5)根据扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,有带为罂粟原植物,没有带的物种为该属其他植物。本发明特点是快速、高效、准确、低成本、操作简便等优势。



1. 一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,基于植物SSR分子标记对罂粟科罂粟属罂粟进行鉴定,使用罂粟属植物的表达序列标签SSR和核基因组SSR来检测罂粟,并找到罂粟原植物有扩增而该属其他植物没有扩增的序列,使用琼脂糖电泳跑胶,在电泳凝胶成像系统中获得扩增条带,仅罂粟原植物能扩增并得到指定长度的扩增条带,所述的指定长度是指罂粟属中罂粟植物SSR分子标记序列特有信息位点长度分别出现在300bp、200bp、100bp有带,而非罂粟植物仅在200bp处有带,进一步获罂粟其特有的SSR引物序列,

该方法包括以下步骤:(1)根据目的基因序列设计特异性的引物;(2)使用设计的引物对罂粟属的植物DNA进行PCR扩增;(3)PCR扩增产物使用4%琼脂糖电泳;(4)使用花青素染色;(5)根据扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,有带为罂粟原植物,没有带的物种为该属其他植物,

其中,所述的根据目的基因序列设计特异性的引物如下:

PSS5 F:5' -TCCATCACCCATAAATCTTCAG-3'

PSS5 R:5' -TGTTGTTGTTGTTGTTGGAAAA-3'

PS70 F:5' -CGGGTTACCCATAACATTAAGC-3'

PS70 R:5' -TGTTTTACGATGAATTTATGAGTTTGA-3'

另外为检测DNA活性,加入一对标定核糖体DNA序列引物:

atpB209 200F: GACCGACCCTGCTCCTGC

atpB209 200R: TGTCCTGAAGTTCTTTGTAACGTTGT

将制得的引物分装在试剂盒中,引物浓度3nmol/L,将引物按以下比例混合A,PSS5:atpB209:PS70为10:3:7。

2. 根据权利要求1所述的一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,其特征在于,SSR的扩增反应体系各组分:

DNA模板,10-120ng/ul,1μL

2×TaqMasterMix 8μL

ddH₂O4μL

A引物2μL。

3. 根据权利要求1所述的一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,其特征在于,PCR扩增程序为:

95℃变性4 min,1个循环;

94℃变性20 s,55℃退火20 s,72℃延伸20 s,进行30个循环;72℃延伸4 min,1个循环,最后4℃保持。

4. 根据权利要求1所述的一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,其特征在于,使用4%琼脂糖凝胶电泳,用普通花青素染色。

使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法

技术领域：

[0001] 本发明属于分子生物学DNA分子标记技术领域，具体涉及对罂粟 (*Papaver somniferum*) 原植物进行鉴定的SSR标记方法，罂粟SSR分子标记及其对应引物序列的开发与应用。

背景技术：

[0002] 罂粟 (*Papaver somniferum*) 为罂粟科 (*Papaveraceae*) 罂粟属 (*Papaver*) 植物，是俗称的鸦片、大烟，也是一种民俗药源植物具有极为重要的价值。罂粟含有100多种生物碱，如吗啡、可待因、蒂巴因、那可汀和罂粟碱都是重要的植物生物碱，可作为医药工业上镇痛药、镇咳药和解痉药的重要原料。但是吗啡和可待因具有严重的毒副作用，吸食者会产生耐受性和成瘾性，特别是吗啡乙酰化而成海洛因对吸食者耐受性和成瘾性发展快，毒副作用大，是滥用最广，毒性最强，危害最大的违禁麻醉品之一。

[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*)。其中虞美人为常见的园艺花卉植物，并不含有吗啡或可待因成分，也无任何有毒因子，不会让人上瘾或依赖。但其形态特征与罂粟较为相似，常常不能通过普通的传统分类来进行分辨，特别是在无花、果实的情况下，对普通的植株更是无法分辨。这就造成了公安机关对于有疑问的植物究竟是保留还是铲除的困惑，无法及时的进行处理，对于及时打击犯罪分子的工作，也常常被一再拖延，对国家和人民造成了不必要的人力和物力的浪费。

[0004] 简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 也称微卫星DNA (Microsatellite DNA)，是基于特异引物的PCR标记，SSR位点存在于细胞核、叶绿体以及线粒体基因组中，是真核生物基因组中普遍存在的一种重复序列。SSR根据来源不同可分为基因组SSR (Genomics SSR, gSSR) 和表达序列标签SSR (Expressed Sequence Tag SSR, EST-SSR)。基因组SSR标记中，核基因组SSR (nuclear simple sequence repeat, nSSR) 在亲缘关系分析、品种鉴定、遗传连锁图谱构建和群体遗传分析等方面作为有用的分子工具。SSR的特点在于其重复序列两端大多是保守的单拷贝序列，可以针对该保守序列区设计特异引物，通过PCR扩增，得到片段大小不同的产物，将产物进行琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳，可将其长度多态性显示出来。

[0005] SSR与其他常用的分子标记相比，其优点在：来源于基因组的编码区序列，开发简单快捷，成本低，引物开发不需要进行克隆和测序等繁琐步骤，充分利用现有测序数据；所需DNA量少，标记数量多而且突变丰富。

发明内容

[0006] 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快速、高效、可靠的基于罂粟属植物分子标记，并利用SSR分子标记快速鉴定罂粟 (鸦片) 的

方法,可提高鉴定结果的高效性、简易性、可靠性、准确性及时效性。

[0007] 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:

[0008] 一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,基于植物SSR分子标记对罂粟科罂粟属罂粟进行鉴定,使用罂粟属植物的表达序列标签SSR和核基因组SSR来检测罂粟,并找到罂粟原植物有扩增而该属其他植物没有扩增的序列,使用琼脂糖电泳跑胶,在电泳凝胶成像系统中获得扩增条带,仅罂粟原植物能扩增并得到指定长度的扩增条带。

[0009] 一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,该方法包括以下步骤:(1)根据目的基因序列设计特异性的引物;(2)使用设计的引物对罂粟属的植物DNA进行PCR扩增;(3)PCR扩增产物使用4%琼脂糖电泳;(4)使用花青素染色;(5)根据扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,有带为罂粟原植物,没有带的物种为该属其他植物。

[0010] 一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,该方法包括以下步骤:

[0011] (1)根据目的基因序列设计特异性的如下引物:

[0012] PSS5F:5' -TCCATCACCCATAAATCTTCAG-3'

[0013] PSS5R:5' -TGTTGTTGTTGTTGTTGGAAAA-3'

[0014] PSS20F:5' -AAGTCCACGGTTTTGGAGG-3'

[0015] PSS20R:5' -GCAACGATTAAAGTTTACTTTGGAG-3'

[0016] PS70F:5' -CGGGTTACCCATAACATTAAGC-3'

[0017] PS70R:5' -TGTTTTACGATGAATTTATGAGTTTGA-3'

[0018] PS120F:5' -TTGTCTGGATACACTCCACA-3'

[0019] PS120R:5' -ATATATATTGCTTTCGTCATATTTGG-3'

[0020] 另外为检测DNA活性,加入一对标定核糖体DNA序列引物:

[0021] atpB209 200F:GACCGACCCTGCTCCTGC

[0022] atpB209 200R:TGTCCTGAAGTTCTTTGTAACGTTGT

[0023] 将制得的引物分装在试剂盒中,引物浓度3nmol/L,将引物按以下比例混合A (PSS5:atpB209:PS70) 10:3:7;B (PSS20:atpB209:PS120) 8:2.5:10;

[0024] (2)使用设计的引物对罂粟属的植物DNA进行PCR扩增;

[0025] (3)PCR扩增产物使用4%琼脂糖电泳;

[0026] (4)使用花青素染色;

[0027] (5)根据扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,有带为罂粟原植物,没有带的物种为该属其他植物。

[0028] 根据所述的一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,SSR的扩增反应体系各组分

	DNA 模板 (10-120ng/ul)	1μL
[0029]	2×TaqMasterMix	8μL
	ddH ₂ O	4μL
	A 或 B 引物	2μL

[0030] 根据所述的一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,PCR扩增程序为:

[0031] 95℃变性4min,1个循环;

[0032] 94℃变性20s,55℃退火20s,72℃延伸20s(进行30个循环);72℃延伸4min,

[0033] 1个循环,最后4℃保持。

[0034] 根据所述的一种使用SSR分子标记对罂粟的鉴定方法,使用4%琼脂糖凝胶电泳使用普通花青素染色。

[0035] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0036] 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SSR分子标记数据库,然后通过比较发现罂粟属中罂粟植物SSR分子标记序列特有信息位点长度分别出现在300bp、200bp、100bp有带,而非罂粟植物仅在200bp处有带,进一步获罂粟其特有的SSR引物序列。

[0037] 本发明使用SSR分子标记的方法来鉴定中国分布的罂粟属植物中罂粟特有的SSR信息长度位点,通过对PSS5、PSS20、PS70和PS120四个引物进行PCR扩增和跑胶,获得有无扩增条带,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

[0038] 图1为罂粟属植物使用A种混合引物扩增产物和产物跑胶图谱。

[0039] 图2为罂粟属植物使用B种混合引物扩增产物和产物跑胶图谱。

具体实施方式

[0040] 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。

[0041] 实施例1

[0042] 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SSR分子标记数据库,通过比较发现罂粟(鸦片)的SSR分子标记特有信息长度位点,进一步获得其特有的SSR分子标记序列。

[0043] 本发明基于植物SSR分子标记对罂粟科罂粟属罂粟的鉴定方法,我们使用EST-SSR设计长度为300bp左右的引物,共71对,得到符合要求的引物两对:PSS5和PSS20;使用nSSR设计长度为100bp左右的引物,共183对,得到符合要求的引物两对:PS70和PS120,这四对引物仅能在罂粟原植物中扩增,而该属的其他植物没有扩增信息。其中PSS5约长293bp、PSS20长328bp、PS70长120bp和PS120长97bp。我们将四对引物配对为两组A(PSS5+PS70)、B(PSS20+PS120),A、B两组分别都加入一对atpB209引物,该引物是从被子植物100多个属的编码区保守序列中设计,长度为200bp,使用该引物作为标定引物,使我们能看到所有参与比较的植物DNA是否均可扩增。将所有引物分装在试剂盒中,引物浓度均稀释成3nmol/L。因为引物混合后进行PCR扩增,会出现引物优先性,导致一些引物能扩增,而另一些引物则无法扩增。我们在经过多次实验后,选择下面的体积比例混合,使我们的目的片段都能够扩增:A(PSS5:atpB209:PS70)10:3:7;B(PSS20:atpB209:PS120)8:2.5:10。

[0044] 本发明的扩增引物采用的是自己设计的SSR分子标记引物,扩增得到的PSS5约长293bp、PSS20长328bp、PS70长120bp和PS120长97bp的序列,通过琼脂糖凝胶电泳图谱得到扩增产物是否有带,根据上述特异性位点条带长度判断是否鉴定为罂粟(鸦片)。

[0045] 本发明的罂粟SSR分子标记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SSR分子标记。采用本发明的上述罂粟SSR分子标记能够快速、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。

[0046] 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SSR分子标记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。

[0047] 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。

[0048] 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本发明的设计序列,具体为:

[0049] PSS5F:5' -TCCATCACCCATAAATCTTCAG-3'

[0050] PSS5R:5' -TGTTGTTGTTGTTGTTGGAAAA-3'

[0051] PSS20F:5' -AAGTCCACGGTTTTGGAGG-3'

[0052] PSS20R:5' -GCAACGATTAAAGTTTACTTTGGAG-3'

[0053] PS70F:5' -CGGGTTACCCATAACATTAAGC-3'

[0054] PS70R:5' -TGTTTTACGATGAATTTATGAGTTTGA-3'

[0055] PS120F:5' -TTGTCTGGATACACTCCACA-3'

[0056] PS120R:5' -ATATATATTGCTTTCGTCATATTTGG-3'

[0057] 另外为检测DNA活性,加入一对标定核糖体DNA序列引物:

[0058] atpB209 200F:GACCGACCCTGCTCCTGC

[0059] atpB209 200R:TGTCCTGAAGTTCTTTGTAACGTTGT

[0060] 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。

[0061] 本发明优选采用15μL的PCR扩增体系,体系配比如下:体系包含DNA模板(10-120ng/ul) 1μL,2×TaqMasterMix 8μL,ddH₂O 4μL,A或B引物2μL。

[0062] 所述PCR的扩增条件为:95℃变性4min,1个循环;94℃变性20s,55℃退火20s,72℃延伸20s,进行30个循环;72℃延伸4min。

[0063] 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。

[0064] 上述扩增体系及扩增条件下所有的备选样品DNA均能扩增出使用引物的序列。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PSS5约长293bp、PSS20长328bp、PS70长120bp和PS120长97bp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)。

[0065] 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,使用琼脂糖凝胶电泳读条带即可。本发明在具体的实施过程中,以严谨的态度,采取了普通

常用PCR测序的方法。

[0066] 本发明中优选采用PCR的扩增体系为用15 μ L的PCR扩增体系,体系配比如下:体系包含DNA模板(10-120ng/ μ l) 1 μ L, 2 \times TaqMasterMix 8 μ L, ddH₂O 4 μ L, A或B引物2 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:95 $^{\circ}$ C变性4min, 1个循环;94 $^{\circ}$ C变性20s, 55 $^{\circ}$ C退火20s, 72 $^{\circ}$ C延伸20s, 进行30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸4min。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。

[0067] 实施例2:

[0068] 1. 罂粟属植物的标本采集和保护:

[0069] 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个种及疆罂粟属1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(样品编号和胶图中编号一致)。

[0070] 表1罂粟属植物标本及来源

样品编号	种名(中文名)	种名(拉丁名)	样品来源
1	灰毛罂粟	<i>Papaver canescens</i> Tolm.	新疆伊犁
2	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	陕西宝鸡
3	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	陕西宝鸡
4	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
5	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
6	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
7	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
8	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
9	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
10	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁

[0071]

[0072]

11	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
12	野罂粟	<i>Papaver nudicaule</i> L.	新疆伊犁
13	长莢罂粟	<i>Papaver dubium</i> L.	新疆伊犁
14	长莢罂粟	<i>Papaver dubium</i> L.	新疆伊犁
15	黑环罂粟	<i>Papaver pavoninum</i> Fisch.	新疆伊犁
16	黑环罂粟	<i>Papaver pavoninum</i> Fisch.	新疆伊犁
17	黑环罂粟	<i>Papaver pavoninum</i> Fisch.	新疆伊犁
18	长白山罂粟	<i>Papaver radicum</i> Rottb. var. <i>pseudo-radicatum</i> (Kitag.) Kitag.	吉林省延边州
19	长白山罂粟	<i>Papaver radicum</i> Rottb. var. <i>pseudo-radicatum</i> (Kitag.) Kitag.	吉林省白山市
20	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	新疆伊犁
21	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
22	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
23	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
24	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
25	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
26	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
27	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
28	虞美人	<i>Papaver rhoeas</i> L.	云南昆明
29	红花疆罂粟	<i>Roemeria refracta</i> (Stev.) DC.	新疆伊犁
30	红花疆罂粟	<i>Roemeria refracta</i> (Stev.) DC.	新疆伊犁
31	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
32	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
33	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
34	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
35	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
36	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
37	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
38	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
39	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁
40	罂粟	<i>Papaver somniferum</i> L.	新疆伊犁

[0073] 2. 总DNA提取

[0074] 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:

[0075] (1) 使用干净的研钵、杵子高压灭菌、烘干、冷却;

[0076] (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;

[0077] (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;

[0078] (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;

[0079] (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);(6) 重复步骤(4)、(5)两次;

[0080] (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;

[0081] (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 LRNase 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。

[0082] 3. PCR扩增反应

[0083] DNA浓度用紫外分光光度计(UV-VIS spectrophotometer(TU-1800))检测,最后稀释到10~120ng/ μ L备用。

[0084] 采用下列SSR分子标记引物扩增:

[0085] PSS5F:5' -TCCATCACCCATAAATCTTCAG-3'

[0086] PSS5R:5' -TGTTGTTGTTGTTGTTGGAAAA-3'

[0087] PSS20F:5' -AAGTCCACGTTTTGGAGG-3'

[0088] PSS20R:5' -GCAACGATTAAAGTTTACTTTGGAG-3'

[0089] PS70F:5' -CGGGTTACCCATAACATTAAGC-3'

[0090] PS70R:5' -TGTTTTACGATGAATTTATGAGTTTGA-3'

[0091] PS120F:5' -TTGTCTGGATACACTCCACA-3'

[0092] PS120R:5' -ATATATATTGCTTTCGTCATATTTGG-3'

[0093] 另外为检测DNA活性,加入一对标定核糖体DNA序列引物:

[0094] atpB209 200F:GACCGACCCTGCTCCTGC

[0095] atpB209 200R:TGTCCTGAAGTTCTTTGTAACGTTGT

[0096] 采用PCR的扩增体系为用15 μ L的PCR扩增体系,体系配比如下:体系包含DNA模板(10-120ng/ μ L) 1 μ L,2 \times TaqMasterMix 8 μ L,ddH₂O 4 μ L,A或B引物2 μ L。测序的反应条件优选为:95 $^{\circ}$ C变性4min,1个循环;94 $^{\circ}$ C变性20s,55 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸20s,进行30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸4min。PCR产物使用4%的琼脂糖凝胶电泳检测条带有无即可。

[0097] 实施例3

[0098] 以药材种植区和野外所采集的无花无果的罌粟和其他罌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,琼脂糖凝胶电泳检测条带有无。鉴定结果显示,若在300bp、200bp、100bp处分别均有条带的疑似物种,可确定为罌粟,该三处位置缺少条带的疑似物种均不是罌粟。

[0099] 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。

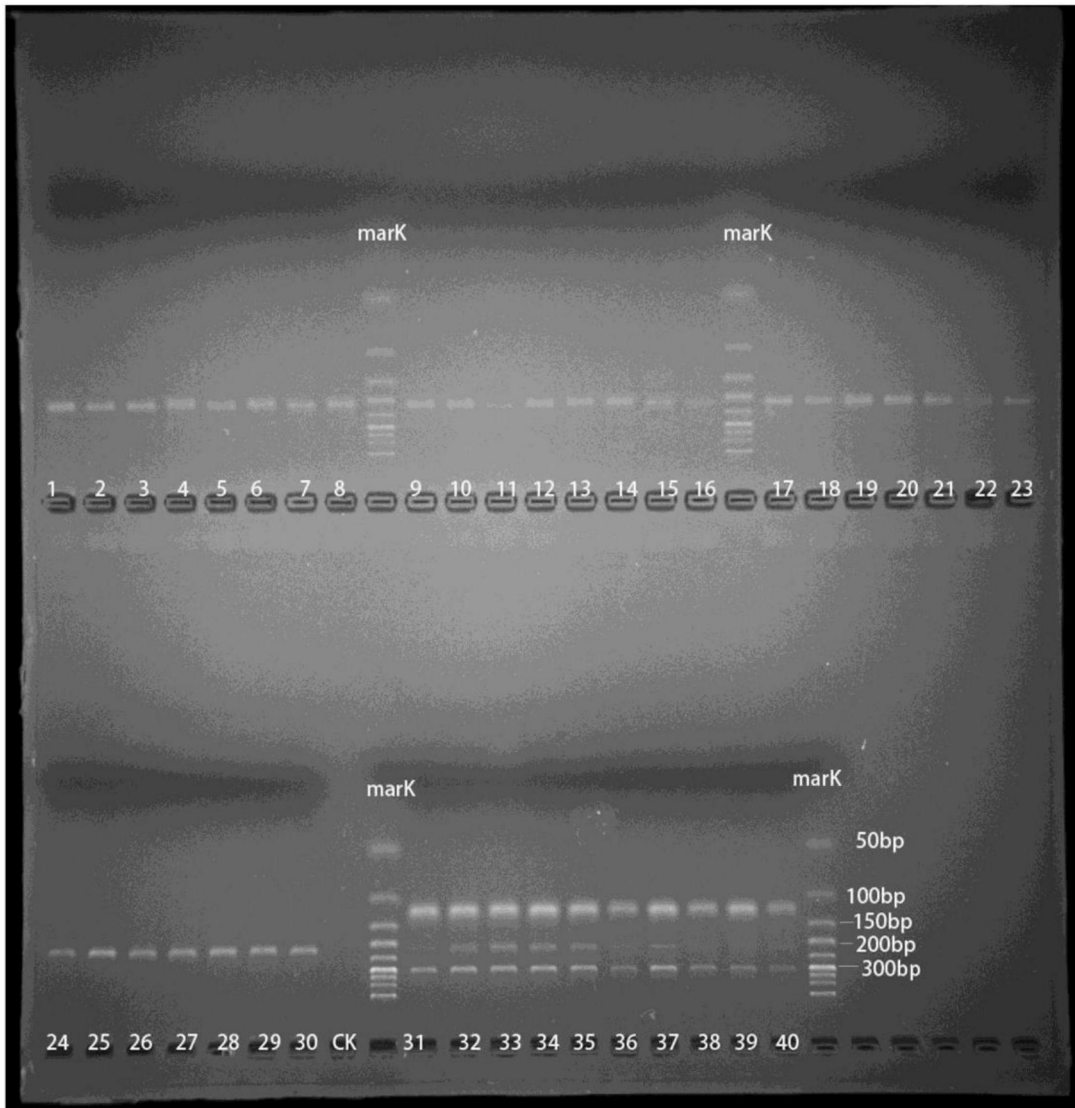


图1

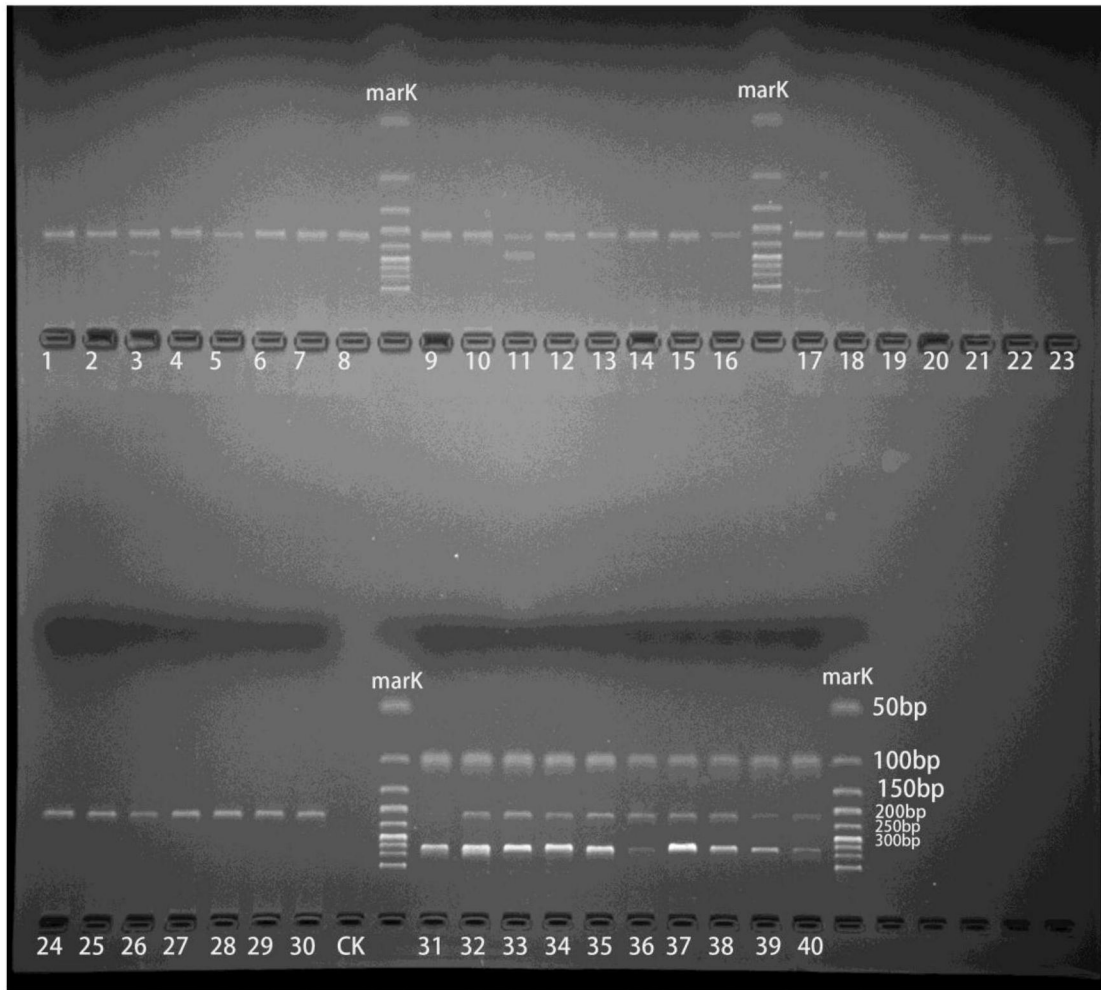


图2