



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107541521 B

(45)授权公告日 2018.08.31

(21)申请号 201710998366.6

审查员 汪未申

(22)申请日 2017.10.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107541521 A

(43)申请公布日 2018.01.05

(73)专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650000 云南省昆明市盘龙区青松路
19号

(72)发明人 杨俊波 何俊 王家艳 王红

李德铤

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C12Q 1/6895(2018.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码及黄花乌头的鉴定方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码及黄花乌头的鉴定方法,属于分子鉴定技术领域。通过广泛调查乌头属药用植物分布区,并尽可能的在物种分布区内进行多个地方采样,构建该属药用植物ITS序列的条形码大数据库,然后通过比较发现黄花乌头特有的ITS序列特有信息位点,进一步获得其特有的DNA条形码:所述DNA条形码为由引物序列SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2扩增得到的总长为629bp的序列,第89bp为A,第443bp为A,第447bp为A,第491bp和第492bp为AT,第499bp为T,第577bp为C。利用该DNA条形码将大大有利于药用植物黄花乌头的快速鉴定。



1. 一种基于大数据DNA条形码鉴定位点的黄花岗头鉴定方法,其特征在于,包括以下步骤:

(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DNA条形码引物序列为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2;

(3) 对所述扩增产物进行测序,测序结果与SEQ ID NO.3比对,特异性位点为:第89bp为A,第443bp为A,第447bp为A,第491bp和第492bp为AT,第499bp为T,第577bp为C;

若扩增产物符合上述特异性位点序列信息,则该待测样本为黄花岗头。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述PCR的扩增体系为25 μ L,组份配比如下:10 μ mol/L正反向引物各1.0 μ L,25mmol/L 10 \times PCR缓冲液2.5 μ L,2.5mM dNTP 2.5 μ L,5 unit/ μ L Taq DNA聚合酶 0.25 μ L,50~100ng/L模板DNA 1.0 μ L,ddH₂O 16.75 μ L。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述PCR的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min,1循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸2min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7min。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述测序为双向测序,所述测序的引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述测序的反应体系为5 μ L:其中ddH₂O 3 μ L,10 μ mol/L正反向引物各0.25 μ L,测序反应混合物0.5 μ L,PCR纯化产物1 μ L。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述测序的反应条件为:96 $^{\circ}$ C预变性10s,50 $^{\circ}$ C退火5s,60 $^{\circ}$ C延伸4min,33个循环。

一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码及黄花乌头的鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子鉴定技术领域,尤其涉及一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码,及利用该DNA条形码鉴定黄花乌头的方法。

背景技术

[0002] 黄花乌头(*Aconitum coreanum* (H.Léveillé) Rapaics),又名关附子、白附子、山喇叭花和黄乌拉花等,为毛茛科乌头属多年生草本药用植物,是吉林省特别是长白山区道地药材。其块根关白附入药,具有祛风、燥湿、化痰止痛之功效。乌头属植物在我国有200余种,同时该属植物均属为有毒植物,乌头类药材使用中同名异物或同物异名的现象普遍存在。国内报道乌头类药中毒屡见不鲜,各种乌头属植物依据传统形态或显微鉴定方法不易辨识。

[0003] DNA条形码技术(DNA Barcoding)是通过对一个标准目的基因的DNA序列进行分析,从而快速、准确地进行物种鉴定的技术。近几年来,DNA条形码技术已经被证明是一个行之有效的生物鉴定手段,不仅可对传统鉴定方法作强有力的补充,而且因为其更客观、准确,突破以往对经验的过渡依赖,能帮助鉴定物种、发现新种等。

[0004] 目前,在乌头属药用植物的相关分子鉴定研究中,存在物种鉴定库构建时样品取样不足,未能考虑不同物种间或同一物种内可能存在不同个体间变异位点异同的问题,导致鉴定的可靠性差,准确率低。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码,及利用该DNA条形码鉴定黄花乌头的方法,提高鉴定结果的可靠性和准确率。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 本发明提供一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码,所述DNA条形码为由引物序列SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2扩增得到的总长为629bp的序列,第89bp为A,第443bp为A,第447bp为A,第491bp和第492bp为AT,第499bp为T,第577bp为C。

[0008] 优选的,所述DNA条形码的序列如SEQ ID NO.3所示。

[0009] 本发明还提供一种基于大数据DNA条形码的黄花乌头鉴定方法,包括以下步骤:

[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629bp的扩增产物,所述DNA条形码引物序列为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2;

[0012] (3) 对所述扩增产物进行测序,按照下列特异性位点进行黄花乌头物种鉴别的序列特征比对:第89bp为A,第443bp为A,第447bp为A,第491bp和第492bp为AT,第499bp为T,第577bp为C;

[0013] 若扩增产物符合上述条件,则该待测样本为黄花乌头。

[0014] 优选的,所述PCR的扩增体系为25 μ L,组份配比如下:10 μ mol/L正反向引物各1.0 μ L,25mmol/L 10 \times PCRbuffer 2.5 μ L,2.5mM dNTP 2.5 μ L,5unit/ μ L Taq DNA聚合酶0.25 μ L,50~100ng/L模板DNA 1.0 μ L,ddH₂O 16.75 μ L。

[0015] 进一步优选的,所述PCR的扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2min,1循环;94 $^{\circ}$ C变性30s,52 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸2min,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7min。

[0016] 优选的,本发明所述测序采用双向测序,所述测序的引物序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示。

[0017] 进一步优选的,所述测序的反应体系为5 μ L:其中ddH₂O 3 μ L,10 μ mol/L正反向引物各0.25 μ L,测序反应混合物0.5 μ L,PCR纯化产物1 μ L。

[0018] 更优选的,所述测序的反应条件为:96 $^{\circ}$ C预变性10s,50 $^{\circ}$ C退火5s,60 $^{\circ}$ C延伸4min,33个循环。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0020] 本发明通过广泛调查乌头属药用植物分布区,并在物种分布区内进行多个地方采样,构建该属药用植物ITS序列的条形码大数据库,然后通过比较发现黄花乌头的ITS序列特有信息位点,进一步获得其特有的DNA条形码。

[0021] 相较于以往的形态学或分子鉴定方法,本发明是首次在对乌头属药用植物进行广泛取样的基础上,利用ITS序列作为DNA条形码鉴定黄花乌头,通过对ITS序列进行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。该方法将大大有利于药用植物黄花乌头的快速鉴定。

附图说明

[0022] 图1为构建乌头属药用植物所用的部分样品的PCR扩增产物图谱,其中,位于右边位置的“M”为GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder;

[0023] 图2为乌头属药用植物所用的部分样品比对序列结果。

具体实施方式

[0024] 本发明通过广泛调查乌头属药用植物分布区,并尽可能的在物种分布区内进行多个地方采样,构建该属药用植物ITS序列的条形码大数据库,然后通过比较发现黄花乌头特有的ITS序列特有信息位点,进一步获得其特有的DNA条形码。

[0025] 本发明的黄花乌头DNA条形码为由引物序列SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2扩增得到的总长为629bp的序列,在该序列中,特异性识别位点为:第89bp为A,第443bp为A,第447bp为A,第491bp和第492bp为AT,第499bp为T,第577bp为C。本发明的扩增引物采用的是ITS序列的通用引物,扩增得到的629bp的序列中,根据上述特异性位点的碱基种类即可鉴定黄花乌头。

[0026] 由于本发明的黄花乌头DNA条形码是基于尽可能多获得的乌头属药用植物材料得到的,考虑到了不同物种间或同一物种内可能存在不同个体间变异位点异同的问题,是一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码。采用本发明的上述黄花乌头DNA条形码能够快速准确的对黄花乌头进行鉴定,克服了现有技术中鉴定可靠性差的缺陷。

[0027] 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

序列与本发明黄花乌头DNA条形码中的特异识别位点进行比对,直接获得鉴定结果。检测过程快速,结果准确性高,可用于药用植物黄花乌头的快速鉴定。

[0028] 本发明中,待测样本的DNA提取方法采用本领域技术人员所熟知的方法。在本发明具体实施例中,采用改良的4×CTAB法提取待测样本的总DNA。本发明对待测样本中DNA来源没有特殊限定,可以为待测样本的叶子、根或茎。

[0029] 本发明中PCR扩增及对扩增引物进行测序时所用的序列均为ITS的通用序列,具体为:

[0030] ITS4 (SEQ ID NO.1) :5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',

[0031] ITS5 (SEQ ID NO.2) :5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。

[0032] 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。

[0033] 本发明优选采用25μL的PCR扩增体系,组份配比为:10μmol/L正反向引物各1.0μL,25mmol/L 10×PCR buffer 2.5μL,2.5mM dNTP 2.5μL,5unit/μL Taq DNA polymerase 0.25μL,50~100ng/L模板DNA 1.0μL,ddH₂O 16.75μL。本发明对扩增体系中的试剂来源没有特殊限定,扩增体系中所用试剂均可采用本领域技术人员所熟知的商用试剂。

[0034] PCR的扩增条件为:94℃预变性2min,1循环;94℃变性30s,52℃退火1min,72℃延伸2min,35个循环;72℃延伸7min。上述扩增体系及扩增条件下所有备筛选的样本DNA序列均能成功扩增。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和扩增条件进行适当合理调整,如改变扩增体系的体积、组分的浓度、调整扩增的温度及时间等,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。若扩增得到629bp的扩增产物,则待测样本有可能为黄花乌头,通过测序比对特异性识别位点对待测样本是否为黄花乌头进行进一步鉴定。

[0035] 本发明对测序的方式没有特殊限定,采用本领域技术人员所熟知的测序方法,如单向测序或双向测序。在本发明具体实施例中,优选采用双向测序。

[0036] 本发明中优选采用5μL的测序反应体系:ddH₂O 3μL,10μmol/L正反向引物各0.25μL,测序反应混合物0.5μL,PCR纯化产物1μL。其中测序所用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℃预变性10s,50℃退火5s,60℃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和测序条件进行适当合理调整,如改变反应体系的体积、组分的浓度、调整测序的温度及时间等,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,采用本领域技术人员所熟知的方法。

[0037] 将测序结果与本发明的黄花乌头DNA条形码进行比对,若满足下列条件则待测样本为黄花乌头:第89bp为A,第443bp为A,第447bp为A,第491bp和第492bp为AT,第499bp为T,第577bp为C。

[0038] 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,检测过程快速、结果准确性高。

[0039] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白,下面结合实施例对本发明进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0040] 实施例1:

[0041] 1、乌头属药用植物标本的采集和保存

[0042] 查阅文献和国内各大标本馆的馆藏信息,根据DNA条形码的采样要求制定野外采样策略,每个物种尽可能的采集其分布区内不同来源的多个个体(1-13个),所有个体的叶片用硅胶干燥保存。共获得乌头属70余种(含变种)206份的叶片材料,其余部分样品的序列信息从NCBI基因库下载(共23条)。其中,黄花草乌头的样品来自黑龙江省、吉林省和辽宁省的5个地方,涵盖该物种的主要分布区,每个样点各采集3份叶片样品。材料清单和样品来源见表1。

[0043] 表1乌头属药用植物标本及来源

[0044]

样品编号	种 中文名	种 拉丁名	样品来源 /Genebank NO.
1	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	黑龙江牡丹江
2	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	黑龙江牡丹江
3	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	黑龙江牡丹江
4	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	吉林白山市
5	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	吉林白山市
6	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	吉林白山市
7	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	吉林吉林市
8	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	吉林吉林市
9	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	吉林吉林市
10	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	辽宁大连市
11	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	辽宁大连市
12	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	辽宁大连市
13	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	辽宁建平县
14	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	辽宁建平县
15	黄花草乌头	<i>Aconitum coreanum</i>	辽宁建平县
16	拟黄花草乌头	<i>Aconitum anthoroideum</i>	新疆阿勒泰
17	拟黄花草乌头	<i>Aconitum anthoroideum</i>	新疆阿勒泰
18	拟黄花草乌头	<i>Aconitum anthoroideum</i>	新疆阿勒泰
19	白狼乌头	<i>Aconitum bailangense</i>	内蒙古阿尔山
20	白狼乌头	<i>Aconitum bailangense</i>	内蒙古阿尔山
21	白狼乌头	<i>Aconitum bailangense</i>	内蒙古阿尔山
22	雾灵乌头	<i>Aconitum wulingense</i>	河北承德
23	雾灵乌头	<i>Aconitum wulingense</i>	河北承德
24	雾灵乌头	<i>Aconitum wulingense</i>	河北承德
25	两色乌头	<i>Aconitum albobviolaceum</i>	辽宁大连
26	两色乌头	<i>Aconitum albobviolaceum</i>	吉林白山
27	两色乌头	<i>Aconitum albobviolaceum</i>	KY417259.1
28	两色乌头	<i>Aconitum albobviolaceum</i>	JF975785.1
29	两色乌头	<i>Aconitum albobviolaceum</i>	JF975784.1
30	狭盔高乌头	<i>Aconitum angustius</i>	KY417261.1
31	狭盔高乌头	<i>Aconitum angustius</i>	KY417262.1

[0045]

32	狭盔高乌头	<i>Aconitum angustius</i>	KY417260.1
33	滇南草乌	<i>Aconitum austroyunnanense</i>	JQ350821.1
34	滇南草乌	<i>Aconitum austroyunnanense</i>	JQ350822.1
35	滇南草乌	<i>Aconitum austroyunnanense</i>	JQ387580.1
36	细叶黄乌头	<i>Aconitum barbatum</i>	KY417266.1
37	细叶黄乌头	<i>Aconitum barbatum</i>	KY417268.1
38	细叶黄乌头	<i>Aconitum barbatum</i>	KY417292.1
39	细叶黄乌头	<i>Aconitum barbatum</i>	KY417265.1
40	西伯利亚乌头	<i>Aconitum barbatum</i> var. <i>hispidum</i>	青海海东
41	西伯利亚乌头	<i>Aconitum barbatum</i> var. <i>hispidum</i>	河南洛阳
42	西伯利亚乌头	<i>Aconitum barbatum</i> var. <i>hispidum</i>	甘肃甘南
43	牛扁	<i>Aconitum barbatum</i> var. <i>puberrulum</i>	山西宁武
44	牛扁	<i>Aconitum barbatum</i> var. <i>puberrulum</i>	山西宁武
45	牛扁	<i>Aconitum barbatum</i> var. <i>puberrulum</i>	山西宁武
46	带岭乌头	<i>Aconitum birobidshanicum</i>	黑龙江伊春
47	带岭乌头	<i>Aconitum birobidshanicum</i>	黑龙江伊春
48	短柄乌头	<i>Aconitum brachypodum</i>	云南丽江
49	短柄乌头	<i>Aconitum brachypodum</i>	云南丽江
50	短柄乌头	<i>Aconitum brachypodum</i>	云南中甸
51	短柄乌头	<i>Aconitum brachypodum</i>	AY189789
52	展毛短柄乌头	<i>Aconitum brachypodum</i> var. <i>laxiflorum</i>	云南中甸
53	短距乌头	<i>Aconitum brevicalcaratum</i>	云南丽江
54	短距乌头	<i>Aconitum brevicalcaratum</i>	云南丽江
55	短距乌头	<i>Aconitum brevicalcaratum</i>	云南丽江
56	褐紫乌头	<i>Aconitum brunneum</i>	甘肃甘南
57	滇西乌头	<i>Aconitum bulleyanum</i>	云南丽江
58	滇西乌头	<i>Aconitum bulleyanum</i>	云南丽江
59	滇西乌头	<i>Aconitum bulleyanum</i>	云南丽江
60	弯喙乌头	<i>Aconitum campylorrhynchum</i>	AY189797
61	弯喙乌头	<i>Aconitum campylorrhynchum</i>	KY417272
62	弯喙乌头	<i>Aconitum campylorrhynchum</i>	AY571359
63	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	湖北咸宁
64	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	江西吉安
65	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	安徽金寨
66	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	安徽金寨
67	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	安徽金寨
68	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	安徽金寨
69	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	江苏南京
70	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	湖北神农架
71	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	云南大理
72	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	四川布拖
73	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	四川布拖
74	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	四川布拖
75	乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>carmichaelii</i>	四川布拖
76	黄山乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>hwangshanicum</i>	安徽黄山
77	黄山乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>hwangshanicum</i>	安徽黄山
78	黄山乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>hwangshanicum</i>	安徽黄山
79	黄山乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>hwangshanicum</i>	浙江天台
80	黄山乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>hwangshanicum</i>	浙江天台

[0046]

81	黄山乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>hwangshanicum</i>	浙江天台
82	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	山西运城
83	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	甘肃陇南
84	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	河南卢氏
85	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	河南卢氏
86	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	河南卢氏
87	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	河南卢氏
88	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	河南卢氏
89	毛叶乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>pubescens</i>	河南卢氏
90	深裂乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>tripartitum</i>	江苏句容
91	深裂乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>tripartitum</i>	江苏句容
92	展毛乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>truppelianum</i>	山东青岛
93	展毛乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>truppelianum</i>	山东泰安
94	展毛乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>truppelianum</i>	河南焦作
95	展毛乌头	<i>Aconitum carmichaelii</i> var. <i>truppelianum</i>	河南焦作
96	黄毛乌头	<i>Aconitum chrysotrichum</i>	四川稻城
97	苍山乌头	<i>Aconitum contortum</i>	云南大理
98	苍山乌头	<i>Aconitum contortum</i>	云南大理
99	苍山乌头	<i>Aconitum contortum</i>	云南大理
100	马耳山乌头	<i>Aconitum delavayi</i>	云南大理
101	马耳山乌头	<i>Aconitum delavayi</i>	云南大理
102	马耳山乌头	<i>Aconitum delavayi</i>	云南大理
103	西南乌头	<i>Aconitum episcopale</i>	贵州毕节
104	西南乌头	<i>Aconitum episcopale</i>	贵州毕节
105	紫乌头	<i>Aconitum episcopale</i> var. <i>villosulipes</i>	云南大理
106	紫乌头	<i>Aconitum episcopale</i> var. <i>villosulipes</i>	云南大理
107	紫乌头	<i>Aconitum episcopale</i> var. <i>villosulipes</i>	云南大理
108	紫乌头	<i>Aconitum episcopale</i> var. <i>villosulipes</i>	云南大理
109	赣皖乌头	<i>Aconitum finetianum</i>	安徽金寨
110	赣皖乌头	<i>Aconitum finetianum</i>	安徽金寨
111	赣皖乌头	<i>Aconitum finetianum</i>	KY417283
112	赣皖乌头	<i>Aconitum finetianum</i>	KY417285
113	赣皖乌头	<i>Aconitum finetianum</i>	KY417284
114	伏毛铁棒锤	<i>Aconitum flavum</i>	甘肃榆中
115	伏毛铁棒锤	<i>Aconitum flavum</i>	青海果洛
116	伏毛铁棒锤	<i>Aconitum flavum</i>	西藏那曲
117	丽江乌头	<i>Aconitum forrestii</i>	云南丽江
118	丽江乌头	<i>Aconitum forrestii</i>	云南丽江
119	丽江乌头	<i>Aconitum forrestii</i>	云南丽江
120	膝瓣乌头	<i>Aconitum geniculatum</i>	云南禄劝
121	膝瓣乌头	<i>Aconitum geniculatum</i>	云南昆明禄劝
122	膝瓣乌头	<i>Aconitum geniculatum</i>	云南昆明
123	瓜盔膝瓣乌头	<i>Aconitum geniculatum</i> var. <i>unguiculatum</i>	云南昆明
124	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnandrum</i>	青海大通
125	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnandrum</i>	甘肃临洮
126	露蕊乌头	<i>Aconitum gymnandrum</i>	四川甘孜
127	瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i>	湖北恩施
128	瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i>	河南洛阳
129	拳距瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i> var. <i>circinatum</i>	云南昭通

[0047]

130	拳距瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i> var. <i>circinatum</i>	云南昭通
131	拳距瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i> var. <i>circinatum</i>	云南昭通
132	拳距瓜叶乌头	<i>Aconitum hemsleyanum</i> var. <i>circinatum</i>	云南昭通
133	鸭绿乌头	<i>Aconitum jaluense</i>	辽宁本溪
134	鸭绿乌头	<i>Aconitum jaluense</i>	辽宁本溪
135	多根乌头	<i>Aconitum karakolicum</i>	新疆伊犁
136	多根乌头	<i>Aconitum karakolicum</i>	新疆和静
137	多根乌头	<i>Aconitum karakolicum</i>	新疆和静
138	展毛多根乌头	<i>Aconitum karakolicum</i> var. <i>patentipilum</i>	新疆伊犁
139	展毛多根乌头	<i>Aconitum karakolicum</i> var. <i>patentipilum</i>	新疆伊犁
140	吉林乌头	<i>Aconitum kirinense</i>	黑龙江伊春
141	吉林乌头	<i>Aconitum kirinense</i>	黑龙江伊春
142	吉林乌头	<i>Aconitum kirinense</i>	黑龙江海林
143	丁布乌头	<i>Aconitum konghoense</i>	西藏林芝
144	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	内蒙古根河
145	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	内蒙古根河
146	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	黑龙江伊春
147	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	山西灵石
148	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	辽宁本溪
149	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	辽宁本溪
150	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	山西宁武
151	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	黑龙江牡丹江
152	北乌头	<i>Aconitum kusnezoffii</i>	辽宁抚顺
153	白喉乌头	<i>Aconitum leucostomum</i>	新疆伊犁
154	白喉乌头	<i>Aconitum leucostomum</i>	新疆伊犁
155	凉山乌头	<i>Aconitum liangshanicum</i>	四川甘孜
156	凉山乌头	<i>Aconitum liangshanicum</i>	四川甘孜
157	凉山乌头	<i>Aconitum liangshanicum</i>	四川甘孜
158	小白撑	<i>Aconitum nagarum</i> var. <i>heterotrichum</i>	云南昭通
159	小白撑	<i>Aconitum nagarum</i> var. <i>heterotrichum</i>	云南昭通
160	小白撑	<i>Aconitum nagarum</i> var. <i>heterotrichum</i>	云南维西
161	无距小白撑	<i>Aconitum nagarum</i> var. <i>heterotrichum</i> f. <i>dielsianum</i>	云南大理
162	无距小白撑	<i>Aconitum nagarum</i> var. <i>heterotrichum</i> f. <i>dielsianum</i>	云南大理
163	无距小白撑	<i>Aconitum nagarum</i> var. <i>heterotrichum</i> f. <i>dielsianum</i>	云南大理
164	林地乌头	<i>Aconitum nemorum</i>	新疆乌鲁木齐
165	林地乌头	<i>Aconitum nemorum</i>	新疆伊犁
166	林地乌头	<i>Aconitum nemorum</i>	新疆和静
167	德钦乌头	<i>Aconitum ouvrardianum</i>	云南中甸
168	铁棒锤	<i>Aconitum pendulum</i>	陕西宝鸡
169	普格乌头	<i>Aconitum pukeense</i>	云南昆明禄劝
170	普格乌头	<i>Aconitum pukeense</i>	云南昭通
171	普格乌头	<i>Aconitum pukeense</i>	云南昆明
172	普格乌头	<i>Aconitum pukeense</i>	云南昆明禄劝
173	美丽乌头	<i>Aconitum pulchellum</i>	云南中甸
174	美丽乌头	<i>Aconitum pulchellum</i>	云南德钦
175	美丽乌头	<i>Aconitum pulchellum</i>	云南昆明禄劝
176	岩乌头	<i>Aconitum racemulosum</i>	重庆南川
177	岩乌头	<i>Aconitum racemulosum</i>	AY150233
178	圆叶乌头	<i>Aconitum rotundifolium</i>	新疆伊犁

	179	圆叶乌头	<i>Aconitum rotundifolium</i>	新疆河津
	180	花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i>	四川西昌
	181	花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i>	云南大理
	182	等叶花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i> var. <i>hupehanum</i>	四川甘孜
	183	等叶花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i> var. <i>hupehanum</i>	云南昭通
	184	等叶花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i> var. <i>hupehanum</i>	四川甘孜
	185	聚叶花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i> var. <i>vaginatatum</i>	甘肃甘南
	186	聚叶花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i> var. <i>vaginatatum</i>	甘肃甘南
	187	聚叶花葶乌头	<i>Aconitum scaposum</i> var. <i>vaginatatum</i>	四川巴中
	188	宽叶蔓乌头	<i>Aconitum sczukinii</i>	黑龙江伊春
	189	宽叶蔓乌头	<i>Aconitum sczukinii</i>	黑龙江伊春
	190	宽叶蔓乌头	<i>Aconitum sczukinii</i>	吉林白山
	191	高乌头	<i>Aconitum sinomontanum</i>	甘肃榆中
	193	匙苞乌头	<i>Aconitum spathulatum</i>	云南大理
	194	匙苞乌头	<i>Aconitum spathulatum</i>	云南大理
	195	匙苞乌头	<i>Aconitum spathulatum</i>	云南大理
	196	玉龙乌头	<i>Aconitum stapfianum</i>	云南丽江
	197	玉龙乌头	<i>Aconitum stapfianum</i>	云南丽江
	198	玉龙乌头	<i>Aconitum stapfianum</i>	云南丽江
	199	玉龙乌头	<i>Aconitum stapfianum</i>	云南丽江
	200	松潘乌头	<i>Aconitum sungpanense</i>	陕西西安
	201	松潘乌头	<i>Aconitum sungpanense</i>	甘肃甘南
	202	松潘乌头	<i>Aconitum sungpanense</i>	AY189795
[0048]	203	白花松潘乌头	<i>Aconitum sungpanense</i> var. <i>leucanthum</i>	四川巴中
	204	白花松潘乌头	<i>Aconitum sungpanense</i> var. <i>leucanthum</i>	四川巴中
	205	白花松潘乌头	<i>Aconitum sungpanense</i> var. <i>leucanthum</i>	AY189796
	206	太白乌头	<i>Aconitum taipeicum</i>	陕西宝鸡
	207	甘青乌头	<i>Aconitum tanguticum</i>	甘肃
	208	甘青乌头	<i>Aconitum tanguticum</i>	甘肃甘南
	209	甘青乌头	<i>Aconitum tanguticum</i>	四川阿坝
	210	毛果甘青乌头	<i>Aconitum tanguticum</i> var. <i>trichocarpum</i>	甘肃榆中
	211	毛果甘青乌头	<i>Aconitum tanguticum</i> var. <i>trichocarpum</i>	甘肃榆中
	212	直缘乌头	<i>Aconitum transsectum</i>	云南昆明
	213	直缘乌头	<i>Aconitum transsectum</i>	云南昆明
	214	直缘乌头	<i>Aconitum transsectum</i>	云南昆明
	215	长白乌头	<i>Aconitum tschangbaischanense</i>	吉林安图
	216	长白乌头	<i>Aconitum tschangbaischanense</i>	吉林安图
	217	长白乌头	<i>Aconitum tschangbaischanense</i>	吉林安图
	218	土官村乌头	<i>Aconitum tuguancunense</i>	云南中甸
	219	土官村乌头	<i>Aconitum tuguancunense</i>	云南中甸
	220	土官村乌头	<i>Aconitum tuguancunense</i>	云南中甸
	221	草地乌头	<i>Aconitum umbrosum</i>	黑龙江伊春
	222	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	云南昆明嵩明
	223	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	云南昆明嵩明
	224	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	云南楚雄武定
	225	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	云南楚雄武定
	226	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	云南昆明晋宁
	227	黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i>	云南昆明晋宁
	228	展毛黄草乌	<i>Aconitum vilmorinianum</i> var. <i>patentipilum</i>	云南昆明
[0049]	229	卷毛蔓乌头	<i>Aconitum volubile</i> var. <i>pubescens</i>	内蒙古根河

[0050] 2、总DNA提取

[0051] 利用改良的4×CTAB法提取上述乌头属植物叶片的总DNA,具体步骤如下:

[0052] (1) 将研钵洗净于烘箱中烘干备用,提取总DNA前用酒精灼烧研钵,杵子,勺子以灭菌。

[0053] (2) 选取干净的叶片放在研钵中,用液氮冷却材料待水份完全损失后,用力研磨材料使之呈粉末状,然后将研磨好的材料转移到预冷的2ml的离心管中。

[0054] (3) 在2ml的离心管中加入1ml预热的4×CTAB提取液和2μlβ-巯基乙醇(2%V/V),使材料完全分散在提取液中,在65℃水浴锅中温浴约1.5小时,期间摇匀3~5次。

[0055] (4) 将温浴的材料取出置于室温下,待冷却至室温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。

[0056] (5) 将上清液(约700~800μl)转移到一新的离心管中(注意在吸取过程中不要把杂质吸起来),再加入等体积的氯仿-异戊醇(体积比24:1),摇匀5~10分钟,然后以10000~12000转/分钟离心5~10分钟。

[0057] (6) 将上清液(约450~600μl)转移到一新的离心管中,加入70%体积的异丙醇,沉降DNA,轻轻颠倒2~3次,可见白色絮状沉淀,室温或4℃冰箱中静置30分钟以上,然后10000~12000转离心5~10分钟,弃上清。

[0058] (7) 用200μl的70%的乙醇和无水乙醇各洗2次,瞬时离心20~30s后弃上清,然后将离心管放在37℃烘箱中(或室温下)使乙醇挥发。待总DNA干燥后加30~50μl TE溶液和1~2μl RNase A于37℃烘箱中用核糖核酸酶(RNaseA)消化2~3小时,然后于-20℃(或4℃)冰箱中保存备用。

[0059] 3、PCR扩增反应

[0060] 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/μL备用。

[0061] 采用下列引物扩增核糖体DNAITS序列:

[0062] ITS4(SEQ ID NO.1):5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',

[0063] ITS5(SEQ ID NO.2):5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。

[0064] PCR反应体系为25μL,组份配比如下:正反引物(10μmol/L)各1.0μL,10×PCRbuffer(Mg²⁺Plus,25mmol/L)2.5μL,dNTP(2.5mM)2.5μL,Taq DNA polymerase(5unit/μL)0.25μL,模板DNA 1.0μL(50~100ng/μL),ddH₂O16.75μL。

[0065] 在以下扩增条件下所有备筛选的引物均能成功扩增:94℃预变性2min,1循环;94℃变性30s,52℃退火1min,72℃延伸2min,35个循环;结束后72℃延伸7min,4℃保存。

[0066] 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乌头属样本引物均能成功扩增。部分样品电泳图谱参见图1。

[0067] 4、扩增产物测序

[0068] 测序反应试剂使用ABI公司的PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ReactionKit,双向测序。

[0069] 测序反应体系为5μL:其中ddH₂O 3μL,测序上下游引物各0.25μL(10μmol/L),测序反应混合物(mix,Big Dye v3.1)0.5μL,PCR纯化产物1μL。

[0070] 测序引物的序列同步骤3中的扩增引物序列,即SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2。

[0071] 测序反应条件为:96℃预变性10s,50℃退火5s,60℃延伸4min,33个循环;结束后加20μL沉降剂(无水乙醇:3M醋酸钠=20:1),4℃沉降过夜。沉降产物经70%酒精纯化后加20μL ddH₂O在95℃条件下变性2分钟后上样,在ABI 3730自动测序仪上测序。

[0072] 5、数据分析

[0073] 运用软件SeqMan (DNASTAR)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。构建乌头属药用植物的ITS序列矩阵,获得ITS序列数据库。

[0074] 6、序列比对及黄花岗头的序列特征

[0075] 序列比对的结果为:整个矩阵总长640bp,由229条序列构成。其中,从NCBI下载23条,本发明获得206条,序列分属乌头属72种(含变种)常见入药植物。在矩阵中,黄花岗头所有样品的ITS序列识别位点为:在92bp碱基为A,206bp和207bp位置为缺失,452bp和456bp位置为A,其余物种为G;500-501bp有AT插入,其余物种样品该位点缺失;508bp位置为T,其余物种样品为G;587bp位置为C,其余为T。

[0076] 若仅看单个物种的序列,所有不同来源的黄花岗头扩增序列一致,用引物ITS4和ITS5扩增得到的扩增产物序列如SEQ ID NO.3所示,该序列的总长为629bp,第89bp为碱基A,443bp为A,447bp为A,491bp和492bp为AT,499bp为T,577bp为C。

[0077] 根据本发明所获得黄花岗头的特异信息位点可以作为黄花岗头的DNA条形码用于黄花岗头的鉴定。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7个特异性识别位点即可对黄花岗头进行快速鉴定。

[0078] 实施例2

[0079] 以药材种植区和野外所采集的无花无果的黄花岗头和其他乌头属植株叶片为材料,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,在已知的黄花岗头植物所获得ITS序列的第89bp为碱基A,443bp为A,447bp为A,491bp和492bp为AT,499bp为T,577bp为C,而其他未知的乌头属植物未见上述特异性位点,由此可以鉴定出黄花岗头样品。

[0080] 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> 一种基于大数据的黄花乌头DNA条形码及黄花乌头的鉴定方法
- [0004] <160> 3
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] tcctccgctt attgatatgc 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 22
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] ggaagtaaaa gtcgtaacaa gg 22
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 629
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> Aconitum coreanum
- [0022] <400> 3
- [0023] cgaaacctgc ccagcagagc gaccccgcaa caagtgaaaa caaaaccgga cggaccgaag 60
- [0024] aggggcgcat gccccgate gcccgccat cggaccgca cctcttctgc gaccgactg 120
- [0025] atttgtgggt ggaggggtgg gttgttgagt ccgcacaaaa caaaaaccg gcgcgacagg 180
- [0026] cgccaaggaa atcttagcgg aaagagggt tccccgttcg cggaggcagt cttcagaatc 240
- [0027] cgatactcaa acgactctcg gcaacggata tctcggtct tgcacgatg aagaacgtag 300
- [0028] cgaaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtc tttgaacgca 360
- [0029] agttgcgccc gaggcatta ggctgagggc acgtctgcct gggcgtcaca cacagcgtcg 420
- [0030] caccctgca accacgttgt cgaggaacgg agattggccc cccgggcccc tgcgggcacg 480
- [0031] gtcggcacia atatgttttt ccccgcggc gacgctcgc gtcagcgggtg gttgtatttc 540
- [0032] tcatectcca aagacatcaa gacgctcgt cctcgtcga tgttgggaca catcgacccc 600
- [0033] acgaagtcgc tttgcgcgac attcaccct 629



图1

