



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116411121 A

(43) 申请公布日 2023.07.11

(21) 申请号 202310373046.7

(22) 申请日 2023.04.10

(71) 申请人 河南省农业科学院经济作物研究所
地址 450000 河南省郑州市金水区花园路
116号

(72) 发明人 李春鑫 王会伟 于美琴 宋万献
朱雅婧 张戈 杨海龙 王树峰

(74) 专利代理机构 郑州先风知识产权代理有限公司 41127
专利代理师 马柯柯

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6858 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

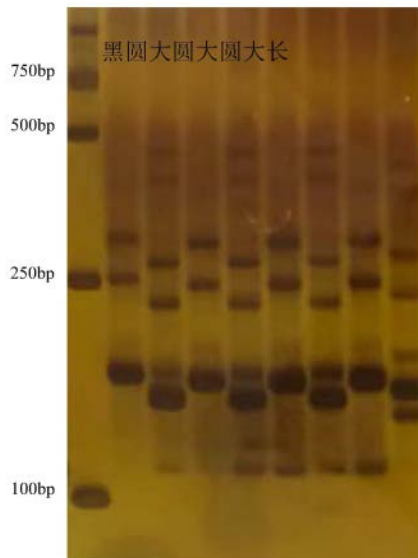
权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一种扩增引物、同时鉴别油莎豆多种粒型和
茎豆种皮性状用试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学及遗传育种技术领域,具体涉及一种扩增引物、同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒。通过对油莎豆种质资源中的代表性粒型和茎豆种皮的基因组测序,选取黑色、中圆粒、大粒、中长粒为筛选样本,发掘大批油莎豆SSR序列位点,经过筛选单拷贝位点,设计单拷贝位点扩增引物对现有的油莎豆进行筛选鉴定,确定可以同时区分出黑色、大粒、中长粒和中圆粒油莎豆的多用型分子标记,并确定靶向扩增该分子标记的扩增引物,组装形成能够鉴定区分出黑色、大粒、中长粒和中圆粒油莎豆品种的快速分子检测产品。经过验证,本发明试剂盒能够从多样混合的油莎豆品种中同时区分筛选出黑色、大粒、中长粒和中圆粒油莎豆品种。



1. 一种扩增引物,其特征在于,靶向扩增如SEQ ID NO.1所示序列。
2. 如权利要求1所述的扩增引物,其特征在于,由正向引物和反向引物组成,正向引物序列为:5' -CCTTTATGTCTCCACACCCC-3';反向引物序列为:5' -GCATGATGGATCGAATTGTG-3'。
3. 一种同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒,其特征在于,包括如权利要求1~2任一项所述扩增引物。
4. 如权利要求3所述的同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒,其特征在于,还包括扩增反应用缓冲液。
5. 如权利要求4所述的同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒,其特征在于,所述扩增反应用缓冲液包括DNA聚合酶、dATP、dCTP、dTTP、dGTP。

一种扩增引物、同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学及遗传育种技术领域,具体涉及一种扩增引物、同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒。

背景技术

[0002] 油莎豆起源于非洲,是近年来我国大力推广种植的新兴油料作物,它具有亩产高、健康功效好、抗逆性强、不与主粮争地等突出优点。2019年以来,为了充分保障我国植物食用油的自主供给,在不占用主粮播种面积的前提下提高油料的产量,油莎豆成为我国科技部和农业农村部推荐的新兴油源作物,科技部于2019年设立了我国首个油莎豆国家重点研发专项,进行油莎豆产业化全产业链关键技术研发,奠定了种质资源、育种和加工的基础。

[0003] 现有的油莎豆种质资源中,其粒型和茎豆种皮基本可以分为中圆粒、中长粒、中长粒。茎豆颜色常见为棕黄色,黑色较为少见。油莎豆不同的粒型和茎豆种皮区分是油莎豆品质分类的主要表型依据之一,也是专收、专储、分类加工等产业化环节的基础。但由于油莎豆的研究基础非常薄弱,遗传学及基因组学发展滞后,至今仍没有参考基因组和重复性高的引物,不同粒型和茎豆种皮的油莎豆种质资源鉴定基本完全依赖于表型和考种鉴定。而表型鉴定存在时间周期长,鉴定结果易受环境和人为影响等问题。以DNA分子标记为代表的分子生物学技术已充分小麦、水稻、玉米等主要粮食作物的性状检测中得以运用,而油莎豆遗传学研究起步晚、基础薄。目前,油莎豆仅有2个油分合成相关基因通过同源克隆的方法被成功发掘,吉林农科院开发了数个RAPD标记对种质资源进行分类,河南省农业科学院经济作物研究所开发了部分KASP标记,以上标记尚未得到在种质资源中的充分验证,同时也无法和油莎豆的粒型和茎豆种皮性状建立联系。目前的茎豆粒型和茎豆种皮这一类重要性状的分子检测技术尚处于缺失状态,为了更好完成国家制定的科研和产业化任务,亟需通过筛选确定油莎豆粒型和茎豆种皮的分子检测标记,开发出能够用于区分出油莎豆粒型和茎豆种皮的分子诊断产品。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺陷,本发明的目的之一在于提供一种扩增引物,靶向扩增如SEQ ID NO.1所示序列,该序列作为分子标记,能够区分出多种不同粒型和茎豆种皮,作为多用性分子标记。

[0005] 本发明目的之二在于提供一种同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒,包括本发明提供的扩增引物,靶向扩增如SEQ ID NO.1所示序列,能够同时区分出黑色、大粒、中长粒和中圆粒四种不同粒型和茎豆种皮。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

一种扩增引物,靶向扩增如SEQ ID NO.1所示序列。

[0007] 可选的,上述扩增引物由正向引物和反向引物组成,正向引物序列为:5' -

CCTTTATGTCTCCACACCCC-3' ;反向引物序列为:5' -GCATGATGGATCGAATTGTG-3' 。

[0008] 一种同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒,包括上述扩增引物。

[0009] 进一步的,上述试剂盒还包括扩增反应用缓冲液。

[0010] 更进一步的,所述扩增反应用缓冲液包括DNA聚合酶、dATP、dCTP、dTTP、dGTP。

[0011] 上述同时鉴别油莎豆多种粒型和茎豆种皮性状用试剂盒的制备方法,包括首先筛选确定能够同时区分鉴别多种油莎豆粒型和茎豆种皮的多用型油莎豆特异性分子标记,其筛选方法包括以下步骤:

1) 测定并获取筛选样本的油莎豆基因组序列信息;

2) 分子标记发掘与引物设计:进行SSR位点检测,筛选SSR序列,设计SSR引物,作为备选引物;

3) 筛选确定分子标记:使用步骤2)的备选引物扩增筛选样本,以单拷贝、重复性高,在染色体上均匀分布为标准,筛选出能够用于区分黑色、大粒、中长粒和中圆粒四种不同粒型和茎豆种皮的分子标记;

4) 以步骤3)筛选确定的分子标记对应的扩增引物,组装获得所述试剂盒;

其中步骤3)筛选确定的分子标记为如SEQ ID NO.1所示序列。

[0012] 进一步的,步骤2) SSR位点检测按照以下配置参数使用软件 MISA对基因组进行搜索,寻找其中的SSR:

配置参数信息:

definition (unit_size,min_repeats) :1-15 2-6 3-5 4-4 5-4 6-4

interruptions (max_difference_between_2_SSRs) : 100

以上述步骤找到的SSR序列为基础,利用软件Primer3.0设计开发一批SSR引物;

可选的,所述筛选样本的茎豆性状包括黑色、中圆粒、大粒、中长粒。

[0013] 更进一步优选的,所述筛选样本中包括1种品种黑色;3种品种的中圆粒;3种品种的大粒;1种品种中长粒。

[0014] 可选的,步骤1)测定并获取油莎豆基因组序列信息的具体方法包括:

(1) DNA提取:采集幼嫩叶片,提取高质量、无降解、高纯度的基因组DNA;

(2) 文库构建:在亲和素磁珠的吸附下,捕获带有生物素的 DNA,对 DNA 片段进行末端修复、加 A、接头连接、评估PCR 扩增循环数、纯化出库的步骤完成整个文库制备;

(3) 文库质控:文库构建完成后,先使用 Qubit2.0 进行初步定量,稀释文库至 1 ng/μl,随后使用 Agilent 2100对文库的 insert size 进行检测,insert size 符合预期后,使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量;

(4) 上机测序:库检合格后,将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行BGI MGISEQ-2000 PE150 测序;

(5) 获取序列信息:

步骤(4)得到的原始图像数据文件经碱基识别(Base Calling)分析转化为原始测序序列,经过数据质控、过滤和拼接处理后,获得油莎豆序列信息。

[0015] 本发明通过对油莎豆种质资源中的代表性粒型和茎豆种皮的基因组测序,选取黑色、中圆粒、中长粒、中长粒为筛选样本,发掘了大批油莎豆SSR序列位点,设计SSR引物,经过筛选单拷贝位点,设计单拷贝位点扩增引物对现有的油莎豆品系和家系、特色种质资源

材料进行筛选鉴定,发现可以同时区分出黑色、大粒、中长粒和中圆粒四种粒型和茎豆种皮油莎豆的多用型分子标记,并确定靶向扩增该分子标记的扩增引物,组装形成能够鉴定区分出黑色、大粒、中长粒和中圆粒油莎豆品种的快速分子检测产品。经过本发明实施例验证,本发明试剂盒能够从多样混合的油莎豆品种中同时区分筛选出黑色、大粒、中长粒和中圆粒油莎豆品种。

[0016] 本发明试剂盒用于油莎豆品种快速鉴定具有以下优势:(1)检测成本低,在利用常规PAGE检测技术时,单个样本检测成本在0.2元左右;(2)检测技术简单、易操作,检测通量方便灵活,可以根据检测需求,灵活调整;(3)对检测设备要求低,仅需要一台PCR仪和电泳设备即可;(4)用时短、重复性高、结果准确。

附图说明

[0017] 图1为实施例1筛选确定的油莎豆多用型分子标记的群体验证结果示意图;
图2为实施例2提供的试剂盒应用于试验例群体1检测结果示意图;
图3为实施例2提供的试剂盒应用于试验例群体2检测结果示意图。

具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明记载的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0019] 下述实施例油莎豆基因序列信息的测定方法为:

1、基因组测序

(1)DNA提取:采集幼嫩叶片,提取高质量、无降解、高纯度的基因组DNA。

[0020] (2)文库构建:在亲和素磁珠的吸附下,捕获带有生物素的DNA,对DNA片段进行末端修复、加A、接头连接、评估PCR扩增循环数、纯化出库的步骤完成整个文库制备。

[0021] (3)文库质控:文库构建完成后,先使用Qubit2.0进行初步定量,稀释文库至1ng/ μ l,随后使用Agilent 2100对文库的insert size进行检测,insert size符合预期后,使用Q-PCR方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 >2 nM),以保证文库质量。

[0022] (4)上机测序:库检合格后,将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求pooling后进行BGI MGISEQ-2000 PE150测序。

2、数据处理

(1)原始测序数据

二代测序平台得到的原始图像数据文件经碱基识别(Base Calling)分析转化为原始测序序列(Sequenced Reads),我们称之为Raw Data或Raw Reads,结果以FASTQ(简称为fq)文件格式存储,其中包含测序序列(Reads)的序列信息以及其对应的测序质量信息。

(2)Clean Data

原始测序数据中会包含接头信息,低质量碱基,未测出的碱基(以N表示),这些信

息会对后续的信息分析造成很大的干扰,通过精细的过滤方法将这些干扰信息去除,得到的数据即为clean data 或 clean reads,该文件的数据格式与Raw data完全一样。

[0025] (3) 数据质控和过滤

①需要过滤掉含有接头序列的reads;②去掉测序read两端连续质量小于15的碱基;③当测序read最终长度小于50bp时,去除此条reads;④仅保留成对reads。

[0026] 实施例1

本实施例筛选获得多用型油莎豆分子标记,其具体方法为:

1、选取筛选样本:8HS-2-9(黑色)、2022-Y(中圆粒)、DL-3-Y(大粒)、48(中圆粒)、DL-17-Y(大粒)、224-5(中圆粒)、DL-17-C(大粒)、383-5(中长粒);样本由河南省农业科学院经济作物研究所油莎豆研究室提供。

[0027] 2、测定并获取筛选样本基因序列信息;

3、标记位点发掘和引物设计

(1) SSR位点检测及引物设计

①按照以下配置参数使用软件 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 对基因组进行搜索,寻找其中的SSR:

配置参数信息:

definition (unit_size,min_repeats) :1-15 2-6 3-5 4-4 5-4 6-4

interruptions (max_difference_between_2_SSRs) : 100

② SSR引物设计

以上步骤找到的SSR序列为基础,利用软件Primer3.0设计开发一批SSR引物:

③筛选标准

单拷贝、重复性高,在染色体上均匀分布,合成后,对群体进行扫描,筛选能够用于同时区分黑色、大粒、中长粒和中圆粒四种不同粒型和茎豆种皮的分子标记;

4、筛选结果:筛选获得用于同时区分油莎豆中圆粒、中长粒、大粒和黑色粒型和茎豆种皮的分子标记,其中分子标记如SEQ ID NO.1所示序列;对应的扩增引物的正向引物序列为:正向引物序列为:5'-CCTTTATGTCTCCACACCCC-3';反向引物序列为:5'-GCATGATGGATCGAATTGTG-3';

5、群体验证:

采用步骤4筛选确定的扩增引物扩增筛选样本,其中

PCR体系:2xEs Taq Master Mix 5 μ L,无菌水3 μ L,正向引物0.5 μ L,反向引物0.5 μ L,油莎豆叶片DNA(15 μ g/ μ L)1 μ L。

[0028] PCR程序:95 $^{\circ}$ C预变性3min,95 $^{\circ}$ C变性30s,65 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,循环15次,每次循环退火温度降1 $^{\circ}$ C,95 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,循环25次,72 $^{\circ}$ C延伸5min。

[0029] 群体验证结果如图1所示,不同油莎豆品种的扩增产物条带分布,显示黑色、大粒、中长粒和中圆粒油莎豆均在150~220bp有各自的特征条带,不同粒型和茎豆种皮油莎豆的特征条带大小为黑色>大粒>中长粒>中圆粒,能够通过区分特征条带的大小区分出不同粒型和茎豆种皮的油莎豆。

[0030] 实施例2

本实施例提供一种能够区分油莎豆中圆粒、中长粒、大粒和黑色茎豆种皮的粒型和茎豆种皮的试剂盒,包括实施例1筛选确定的扩增引物。

[0031] 进一步还包括扩增反应缓冲液;更进一步的,所述扩增反应缓冲液包括DNA聚合酶、dATP、dCTP、dTTP、dGTP。

[0032] 试验例实施例2提供的试剂盒用于区分油莎豆中圆粒、中长粒、大粒和黑色粒型和茎豆种皮的效果验证

1、试验群体:

群体1:2022年河南省油莎豆区试材料,共24个;

群体2:河南省农业科学院经济作物研究所油莎豆团队家系材料,共48个,其编码分别为252、273、306、295、322、296、449、330、297、4、315、275、251、307、541、豫油莎1号、462、574、548、363、353、319、468、豫油莎5号、323、411、549、543、540、593、426、407、538、518、369、539、625、586、555、294、405、26、394、276、485、544、317、597、8HS-1-3、DL-17-C、8HS-2-2、PDL-15-5;

2、试验方法:提取所有试验群体油莎豆叶片DNA,采用实施例2提供的试剂盒扩增DNA,对扩增产物进行电泳分析;

其中PCR体系:2xEs Taq Master Mix 5 μ L,无菌水3 μ L,正向引物0.5 μ L,反向引物0.5 μ L,油莎豆叶片DNA(15 μ g/ μ L) 1 μ L。

[0033] PCR程序:95 $^{\circ}$ C预变性3min,95 $^{\circ}$ C变性30s,65 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,循环15次,每次循环退火温度降1 $^{\circ}$ C,95 $^{\circ}$ C变性30s,50 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸30s,循环25次,72 $^{\circ}$ C延伸5min。

[0034] 采用实施例2提供的试剂盒对群体1各个材料的DNA进行扩增,对扩增条带进行电泳分析,结果如图2所示,比较各个材料在150-220bp的特征条带的长短,按照黑色>大粒>中长粒>中圆粒的判断原则,区分出8号材料为大粒类型,14号材料为中长粒类型材料,9号为黑色类型,其余均为中圆粒类型材料;

采用实施例2提供的试剂盒对群体2各个材料的DNA进行扩增,对扩增条带进行电泳分析,结果如图3所示,比较各个材料在150~220bp有特征条带的大小,按照黑色>大粒>中长粒>中圆粒的判断原则,区分出306和555为中长粒类型,8HS-1-3和8HS-2-2为黑色类型,DL-17-C和PDL-15-5为大粒类型,其余材料为中圆粒类型材料。

[0035] 本发明试剂盒在实际检测过程中,通常会根据需要设置阳性对照(即已知黑色、大粒、中长粒或中圆粒粒型和茎豆种皮材料)。具体过程为:利用本发明提供的扩增引物,完成对未知样本和阳性对照材料的PCR扩增、电泳后,以阳性对照在150-220bp的特征条带为标准,未知样本与阳性对照带型完全一致,则判定未知样本性状与阳性样本茎豆粒型和种皮性状相同。

[0036] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

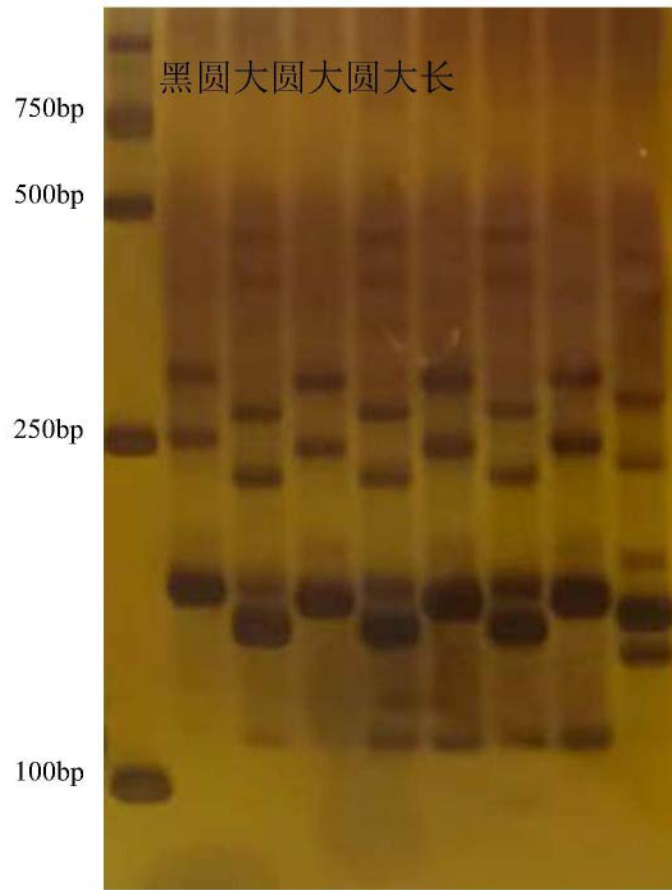


图1

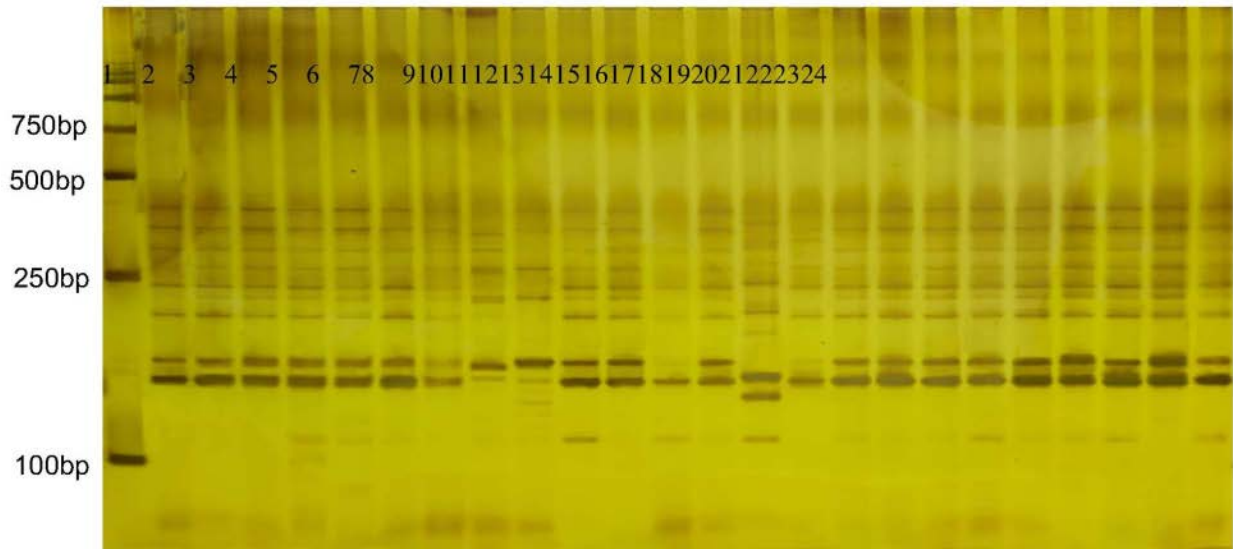


图2

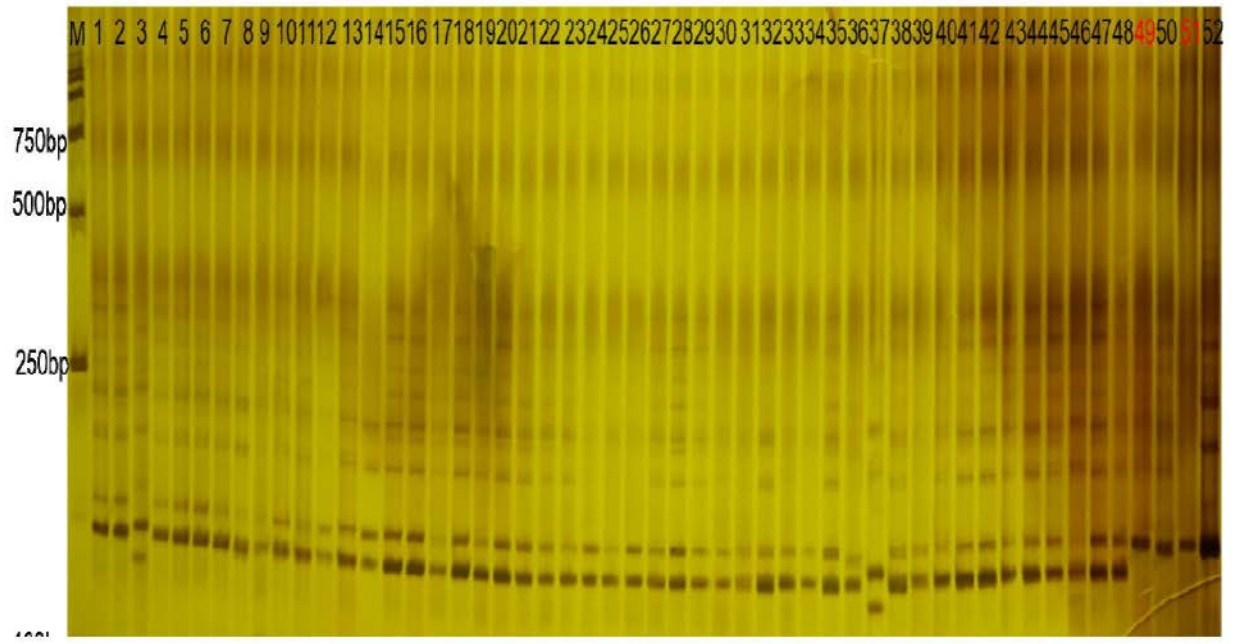


图3