

# 用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物组

申请号：[201610539895.5](#)

申请日：2016-07-08

申请(专利权)人 [扬州大学](#)  
地址 [225009 江苏省扬州市大学南路88号](#)  
发明(设计)人 [杜予州 常亚文](#)  
主分类号 [C12N15/11\(2006.01\)I](#)  
分类号 [C12N15/11\(2006.01\)I](#) [C12N15/10\(2006.01\)I](#)  
公开(公告)号 [105950618A](#)  
公开(公告)日 [2016-09-21](#)  
专利代理机构 [南京知识律师事务所 32207](#)  
代理人 [卢亚丽](#)



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105950618 A

(43)申请公布日 2016.09.21

(21)申请号 201610539895.5

(22)申请日 2016.07.08

(71)申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72)发明人 杜予州 常亚文

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51)Int. Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

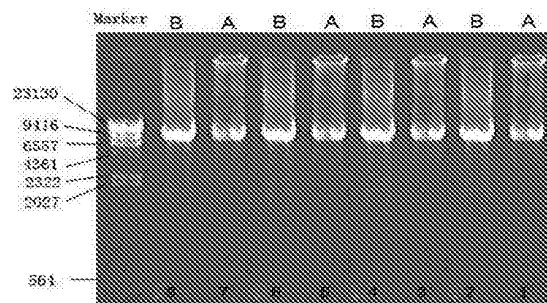
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物组

(57)摘要

本发明公开了一种用于扩增覆盖斑潜蝇属昆虫线粒体全基因组的长片段的通用引物组,该引物组由两对引物组成,其序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.4所示。采用本发明的扩增引物,可以有效地扩增出多种斑潜蝇属物种线粒体基因组的长片段,有助于缩短获取分子数据的周期,为斑潜蝇属昆虫的系统发育研究及分子鉴定特异性引物位点选择提供了重要工具。



1. 用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体全基因组长片段的通用引物组, 其特征在于, 由两对引物组成, 其序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.4所示。

2. 一种斑潜蝇属昆虫线粒体全基因组序列的扩增方法, 其特征是采用权利要求1所述的引物组, 用25 $\mu$ l PCR体系在PCR扩增条件下进行目标片段扩增。

3. 如权利要求2所述的方法, 其特征在于所述的25 $\mu$ l PCR体系是: 5.8 $\mu$ L MilliQ H<sub>2</sub>O, 2.5 $\mu$ L 添加Mg<sup>2+</sup>的10 $\times$  buffer, 3.0 $\mu$ L dNTPs, 2.5 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 3.0 $\mu$ L上游引物, 3.0 $\mu$ L下游引物, 0.2 $\mu$ L TaKaRa LA Taq酶, 5.0 $\mu$ L DNA模板。

4. 如权利要求2所述的方法, 其特征在于所述的PCR扩增条件是: 93 $^{\circ}$ C预变性2min; 92 $^{\circ}$ C变性10s, 54 $^{\circ}$ C退火30s, 68 $^{\circ}$ C延伸8min, 扩增20个循环; 之后92 $^{\circ}$ C变性10s, 54 $^{\circ}$ C退火30s, 68 $^{\circ}$ C延伸8min, 且每一循环增加20s, 扩增20个循环; 最后68 $^{\circ}$ C延伸7min。

## 用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物组

### 技术领域

[0001] 本发明涉及两对用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物。

### 背景技术

[0002] 斑潜蝇属(*Liriomyza* Mik)隶属于双翅目(Diptera),潜蝇科(Agromyzidae),植潜蝇亚科(Phtomyzinae),是一类危害蔬菜、花卉的世界性害虫。斑潜蝇寄主范围广,成、幼虫均可对作物造成危害,幼虫潜食寄主植物叶片或叶柄,严重影响寄主植物的光合作用,导致寄主植物落叶、落花,发育延迟并枯死,成虫在叶片上取食、产卵,植物受害伤口还为病菌入侵提供了途径。根据国内外文献记载和各地普查的情况统计,目前该属有19种害虫在我国有分布(包括我国台湾和香港特别行政区),包括全世界最危险、发生最严重的四种典型的多食性斑潜蝇:美洲斑潜蝇(*L. sativae* Blanchard)(1938)、三叶斑潜蝇(*L. trifolii* Burgess)(1880)和南美斑潜蝇(*L. huidobrensis* Blanchard)(1926),以及番茄斑潜蝇(*L. bryoniae* Kaltentbach)(1858)。

[0003] 斑潜蝇属内各种昆虫之间大部分在外形上非常相似,仅从形态学上难以区分,为准确防治带来困难。因此利用长片段扩增技术测定并分析斑潜蝇属的线粒体基因组特征,希望从分子水平深入全面的挖掘斑潜蝇的遗传信息,并为斑潜蝇属近缘种的鉴定和种群分化研究及进一步准确有效的控制其危害提供科学依据。

[0004] 近年来,随着分子技术和高通量技术的快速发展,线粒体基因组已成为区分物种和研究物种进化关系的热点研究对象。因此,利用线粒体基因组对斑潜蝇属昆虫进行系统发育分析是一种较好的方法。目前,昆虫遗传研究过程中,小规模线粒体基因组研究的主流方法仍然是传统的基于PCR扩增产物的引物步移法。该方法使用的引物数量较多、扩增效率低、对模板纯度要求高、耗时长,并且缺少足够的特异性,这将阻碍昆虫线粒体基因组分子数据的快速积累。而基于长PCR方法不仅能保证得到足够的线粒体全基因组数量,而且排除了核中线粒体假基因的干扰。长PCR扩增的难度随扩增片段长度增加而增加,一次性扩增16kb的片段难度很大,最有效的方法是将全线粒体基因组分为2-3个相互重叠的长片段进行扩增,近年来迅速应用于动物的线粒体测序工作。目前国际上没有专门针对扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物的相关报道。

### 发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段扩增的通用引物组,它能满足现有技术的上述需求。

[0006] 本发明用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物组,由两对用引物组成,其序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.4所示。

[0007] 本发明还公开了一种斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的扩增方法,是采用上述的引物,用25 $\mu$ l PCR体系在特定PCR扩增条件下进行目标片段扩增。

[0008] 所述的25 $\mu$ l PCR体系是:5.8 $\mu$ l MilliQ H<sub>2</sub>O,2.5 $\mu$ l添加Mg<sup>2+</sup>的10 $\times$ buffer,3.0 $\mu$ l

dNTPs, 2.5 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 3.0 $\mu$ L上游引物, 3.0 $\mu$ L下游引物, 0.2 $\mu$ L TaKaRa LA Taq酶, 5.0 $\mu$ L DNA模板。

[0009] 所述的PCR扩增条件是: 93 $^{\circ}$ C预变性2min; 92 $^{\circ}$ C变性10s, 54 $^{\circ}$ C退火30s, 68 $^{\circ}$ C延伸8min, 扩增20个循环; 之后92 $^{\circ}$ C变性10s, 54 $^{\circ}$ C退火30s, 68 $^{\circ}$ C延伸8min, 且每一循环增加20s, 扩增20个循环; 最后68 $^{\circ}$ C延伸7min。

[0010] 本发明根据昆虫纲昆虫的线粒体基因组存在保守区域的特性, 通过比对Genbank中不同目昆虫的线粒体基因组序列设计出扩增引物。采用本发明的斑潜蝇属线粒体基因组长片段扩增引物, 可以有效地扩增出斑潜蝇属不同物种的长片段序列, 填补了斑潜蝇属长片段没有通用的扩增引物的空白, 对斑潜蝇属不同种的昆虫进行大规模的长片段测序, 将产物直接进行高通量测序或者通过Sub-PCR扩增, 能有效缩短分子数据的获取周期, 为我国斑潜蝇属昆虫的系统发育和种群遗传结构研究提供了重要工具。本发明涉及的扩增引物较过去传统方法有较大的优势, 具体表现为: 本引物能有效扩增出总长近16000bp的长片段, 完全覆盖线粒体基因组全长, 而过去的传统方法有效扩增长度一般为1000bp左右, 且扩增效率低, 不利于上述研究的数据分析。利用本引物对斑潜蝇属昆虫进行大规模的系统发育进化分析, 能显著降低实验成本, 缩短实验周期, 提高实验的准确性。

#### 附图说明

[0011] 图1是本发明引物在扩增斑潜蝇属4种昆虫线粒体长片段的引物覆盖图。

[0012] 图2是本发明引物对斑潜蝇属4种昆虫线粒体长片段的扩增效果图。1-2为三叶斑潜蝇; 3-4为美洲斑潜蝇; 5-6为南美斑潜蝇; 7-8为番茄斑潜蝇; M为Marker。

#### 具体实施方式

[0013] 本发明的斑潜蝇属线粒体基因组长片段的扩增引物筛选方法共分两个步骤: 1. 据引物设计原则, 通过对已测出的六足总纲动物mtDNA序列的比对, 尽量在保守区域进行引物的设计, 同时考虑引入简并位点增加引物通用性, 最终设计2对长PCR引物, 通过长PCR分别扩增2条相互重叠并覆盖全线粒体基因组的大片段; 2. 将合成的引物对斑潜蝇属昆虫线粒体基因组进行扩增, 检测其在斑潜蝇属中的通用性和扩增效率。

[0014] 下面结合实例对发明做进一步说明:

[0015] 1. 样品准备: 样品均使用存放于扬州大学应用昆虫研究所标本室内存放于100%酒精的斑潜蝇属不同种的昆虫, 包括三叶斑潜蝇、美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、番茄斑潜蝇等不同种斑潜蝇属昆虫。

[0016] 2. DNA提取: Axygen试剂盒提取DNA, 具体步骤参照说明书。

[0017] 3. 数据来源: 数据来源于美国国立生物技术信息中心(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.gov/>)。

[0018] 4. 序列比对: 利用ClustalX软件将不同目昆虫的线粒体基因组全序列进行比对, 找出比较保守、碱基变异度最小的序列区域。

[0019] 5. 引物合成: 根据上述的比对结果, 利用引物设计软件Primer Premier 5在碱基变异度最小的序列区域设计出2对引物。引物序列为

[0020]

	引物名称	引物序列 (5'-3')
引物 AF	SEQ ID NO.1	ATATTACAGTAGGAATAGAYGTWGAYACWCG
引物 AR	SEQ ID NO.2	GTWACTAAAGGRTTWGCTGGAATAAARTTATC
引物 BF	SEQ ID NO.3	GGAGATCCWGATAATTTTATTCCAGCWAAYCC
引物 BR	SEQ ID NO.4	CTATGATTTGCYCCACARATTTCTGAACATTG

[0021] 6. 引物扩增:将上述扩增引物分别应用于PCR扩增所采集的样本。

[0022] 7. 扩增结果检测:扩增引物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果显示,该引物可以有效地扩增斑潜蝇属昆虫的线粒体长片段。利用这2对引物扩增出的DNA片段总长度约为16000bp,覆盖斑潜蝇属昆虫线粒体基因组(图1),且琼脂糖凝胶电泳检测条带较为单一(图2)。本发明引物可以有效地扩增出斑潜蝇属不同种的线粒体基因组长片段,且测序结果较准确。

[0023] 8. 引物扩增条件:

	成分	反应体积 (25/μL)
	MiliQ H <sub>2</sub> O	5.8μL
	10×LA PCR Buffer I (Mg <sup>2+</sup> Free)	2.5μL
	dNTPs (2.5 mM)	3.0uL
[0024]	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5μL
	Forward primer (10 μM)	3.0μL
	Reverse primer (10 μM)	3.0μL
	TaKaRa LA Taq polymerase	0.2μL
	Template DNA	5.0μL

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 扬州大学

&lt;120&gt; 用于扩增斑潜蝇属昆虫线粒体基因组长片段的通用引物组

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

atatttacag taggaataga ygtwgayacw cg

32

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 2

gtwactaaag grttwgctgg aataaartta tc

32

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 3

ggagatccwg ataattttat tccagcwaay cc

32

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 4

ctatgatttg cyccacarat ttetgaacat tg

32

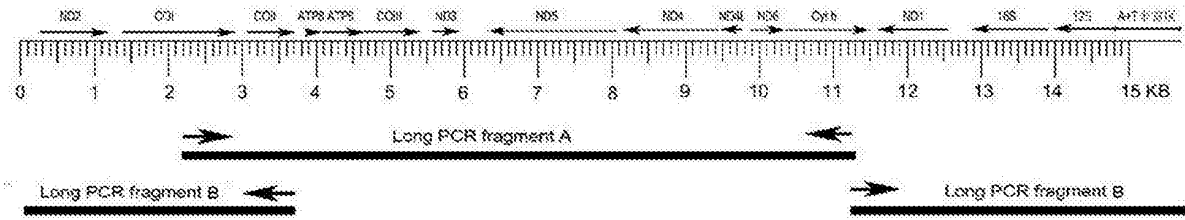


图1

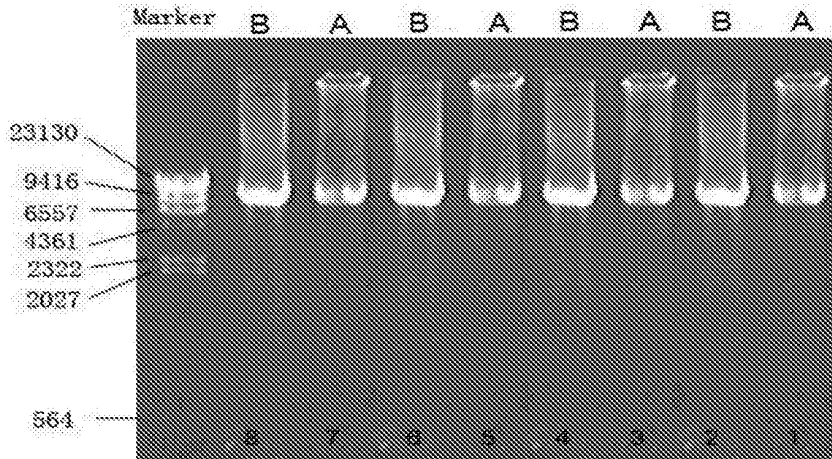


图2