

# 用于快速鉴定三种斑潜蝇的特异性引物、试剂盒及检测方法

申请号：[201510525069.0](#)

申请日：2015-08-24

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 王静静 陆明星 龚伟荣](#)  
主分类号 [C12Q1/68\(2006.01\)I](#)  
分类号 [C12Q1/68\(2006.01\)I](#) [C12N15/11\(2006.01\)I](#)  
公开(公告)号 [105002296A](#)  
公开(公告)日 [2015-10-28](#)  
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 105002296 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201510525069. 0

(22) 申请日 2015. 08. 24

(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 王静静 陆明星

龚伟荣

(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.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

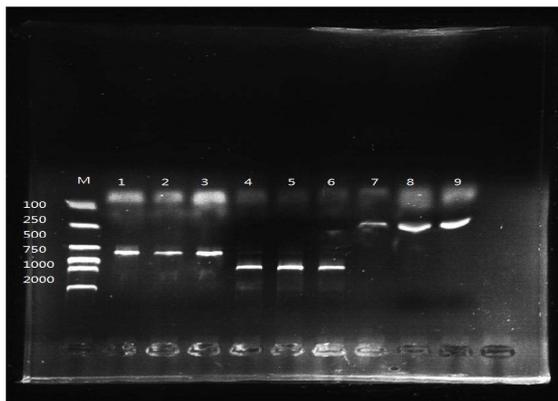
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

用于快速鉴定三种斑潜蝇的特异性引物、试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及用于快速鉴定 3 种入侵斑潜蝇的特异性引物、试剂盒及检测方法,所述的特异性引物序列如 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。采用本发明的扩增引物,能准确而快速地鉴别 3 种入侵斑潜蝇,该方法操作简便快捷,具有广泛的适用性。本发明为 3 种斑潜蝇的快速鉴定及检疫检验提供了重要的技术支持,具有重要的实用价值。



1. 用于快速鉴定 3 种重要斑潜蝇种类的特异性引物组,其特征在于,由 4 条引物组成,引物序列如 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。

2. 一种斑潜蝇 PCR 鉴定用试剂盒,包括 PCR 试剂和特异性引物,其特征在于,所述特异性引物是由 4 条引物组成的引物组,其序列如 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。

3. 一种用于 3 种重要斑潜蝇的分子鉴定方法,其特征在于,用权利要求 1 所述的 4 条特异性引物对待测样品进行 PCR 扩增,根据扩增产物的大小鉴定出三叶斑潜蝇,美洲斑潜蝇,南美斑潜蝇,其中三叶斑潜蝇的扩增片段为 705bp,美洲斑潜蝇的扩增片段为 1055bp,南美斑潜蝇的扩增片段为 358bp。

## 用于快速鉴定三种斑潜蝇的特异性引物、试剂盒及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测鉴定技术,具体地说涉及对 3 种重要斑潜蝇分子鉴定的特异性引物及快速分子鉴定方法。

### 背景技术

[0002] 斑潜蝇属 (*Liriomyza*) 的昆虫统称为斑潜蝇,隶属于双翅目 (*Diptera*),潜蝇科 (*Agromyzidae*),植潜蝇亚科 (*Phytomyzinae*)。目前全世界已知斑潜蝇 300 种,并均为植食性害虫 (Spence, 1973 ;陈小琳和汪兴鉴,2000 ;陈文龙等,2007)。在已知的斑潜蝇种类中,许多种类均为重要的农业害虫,对农作物造成严重危害,在许多国家被列为检疫性害虫 (Spence, 1989 ;康乐,1996)。根据国内外文献记载和各地的普查统计,目前我国记录斑潜蝇 19 种 (陈小琳和汪兴鉴,2000 ;陈文龙等,2007),其中发生最为严重有 3 种,即美洲斑潜蝇 (*Liriomyza sativae*)、三叶斑潜蝇 (*L. trifolii*)、南美斑潜蝇 (*L. huidobrensis*),它们均为外来有害生物,也是我国进境检疫性害虫。近年来,随着设施栽培的发展,蔬菜斑潜蝇的发生与危害程度日趋严重。因此,准确地利用分子生物学技术对这 3 种斑潜蝇进行快速而准确鉴定,对生产上指导这些害虫的防治具有重要意义 ;同时也可作为检疫部门进行快速通关的检验检疫提供技术支撑。

[0003] 由于上述 3 种重要斑潜蝇的外部形态相似,生态位重叠严重,其鉴定容易混淆,常给检疫、测报和防治等工作带来困难,同时由于在田间采集的斑潜蝇大多为潜食在叶片中的幼虫,想要经济方便的鉴定其种类必须等到成虫羽化后通过形态学特征加以鉴定费时费力。因此开发者 3 种重要斑潜蝇的快速鉴定技术显得极为重要。目前国内外对其鉴定识别大多为形态学上的,分子鉴定方法的研究也多为通过传统的分子检测方法,利用 DNA 测序技术虽然能够准确鉴定,但一方面测序成本比较高,另一方面测序过程所需时间周期比较长,达不到快速的要求。因此目前需要尽快建立一套快速灵敏的鉴定检测方法,以便对这三种斑潜蝇作出准确、快速的鉴定,从而确保对外贸易的正常发展。

### 发明内容

[0004] 本发明目的是提供一套用于快速鉴定三种重要斑潜蝇种类的特异性引物,它能满足现有技术的上述需求。

[0005] 用于快速鉴定三种重要斑潜蝇种类的特异性引物组,由 4 条引物组成,引物序列如 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 所示。

[0006] 一种对于 3 种重要斑潜蝇的分子鉴定方法,用上述的 4 条特异性引物对待测样品进行 PCR 扩增,根据扩增产物的大小鉴定出三叶斑潜蝇,美洲斑潜蝇,南美斑潜蝇,其扩增片段的大小分别为 705bp、1055bp 和 358bp。

[0007] 本发明还公开了三种重要斑潜蝇线粒体 COI 基因序列扩增方法,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  $\mu$ l 10 $\times$ buffer (+Mg<sup>2+</sup>), 1  $\mu$ l dNTP (2.5mM), 1  $\mu$ l 引物 (10  $\mu$ M) 共 4  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l Taq 酶 (5  $\mu$  /  $\mu$ l), 2  $\mu$ l DNA 模板 (100ng), 12.5  $\mu$ l 双蒸水。

[0009] 所述的 PCR 扩增条件是 :94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 58 $^{\circ}$ C (T<sub>m</sub>) 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

[0010] 本实验从分子水平依据三种斑潜蝇线粒体 COI 基因设计出四条引物, 利用这四条引物, 在利用多重 PCR 技术进行扩增, 结果显示这四条引物的扩增结果能够有效快速地区分出三种斑潜蝇。同时每种斑潜蝇都设置了 4 个重复, 结果显示该套引物对于不同的斑潜蝇以及同种斑潜蝇的 3 个重复均体现出较好的稳定性, 保证了鉴定结果的准确性, 说明该套引物具有较高的灵敏度。

[0011] 另外, 可以将本发明引物以及相关试剂组装成试剂盒, 以方便使用。一种斑潜蝇 PCR 鉴定用试剂盒, 包括 PCR 试剂和上述特异性引物组。本发明的试剂盒可以由多个隔断所形成, 以容纳固定一个或多个如管或小瓶的容器。这些容器之一或者多个可以装有本发明的引物, 根据需要该引物可以是冻干形式或溶于缓冲液中的状态。另外, 本发明的试剂盒中还可以包括用于 PCR 反应的一种或多种酶 / 试剂, 以及实施本发明所需要的其它成分及用具。该试剂盒能够同时快速准确地鉴别出三叶斑潜蝇, 美洲斑潜蝇, 南美斑潜蝇, 三种斑潜蝇, 同时该试剂盒检测方法无需对反应体系及反应程序进行调整, 而且整个检测过程 (包括 PCR 反应和电泳检测) 耗时不到 3 小时, 大大缩短了检测时间。本试剂盒的缺点是必须确定待测样品属于三叶斑潜蝇, 美洲斑潜蝇, 南美斑潜蝇才能适用, 一旦超出这三种斑潜蝇范围, 该试剂盒不再适用, 但可以根据需要重新设计一对或多对上游引物, 利用其扩增结果及其组合, 在原来试剂盒的基础上重新修改构成一个新的试剂盒, 因此, 利用该方法构建的试剂盒可控性很好, 可以随时根据检疫对象而扩大试剂盒的检测范围。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

[0012] 图 1 是本发明引物组对扩增三种斑潜蝇成虫电泳检测图谱。

[0013] 其中, 泳道 1-3 号为三叶斑潜蝇, 4-6 号为美洲斑潜蝇, 7-9 号为南美斑潜蝇 M 为 Marker DL2000。

[0014] 图 2 是本发明引物组对扩增三叶斑潜蝇各虫态的电泳检测图谱。

[0015] 其中, 泳道 1-3 号为三叶斑潜蝇幼虫, 4-6 号为三叶斑潜蝇蛹, 7-9 号为三叶斑潜蝇成虫 M 为 Marker DL 2000。

## 具体实施方式

[0016] 1. 引物设计

[0017] 下载 GenBank 中已测的 3 种斑潜蝇的 mtDNA COI 基因序列的登记号分别为 :三叶斑潜蝇 (*Liriomyzatrifolii*, EU219614), 美洲斑潜蝇 (*Liriomyzasativae*, AY375175), 南美斑潜蝇 (*Liriomyzahuidobrensis*, EU219615)。根据引物设计原则及注意事项, 尽量在特异性区域进行引物的设计, 使用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.71 引物设计软件在 3 种斑潜蝇的 mtDNA COI 基因范围内自动搜索出合适的引物, 用 Oligo 6.71 软件对每条引物进行评价和修改, 以避免存在引物内或引物间二聚体以及引物错配位点的出现等, 最终设计出 3

种斑潜蝇的 4 条引物 (表 1)。

[0018] 表 1. 本研究设计的 4 条特异性引物序列

[0019]

| 上/下游 | 引物名称 | 引物序列 (5' → 3')                                |
|------|------|---|
| F    | Lt   | CAATTACAATACTATTAACAGACCG<br>(SEQ ID NO.1)    |
|      | Ls   | AGCTCCAGACATAGCATTTCCTCG<br>(SEQ ID NO.2)     |
|      | Lh   | TTCAGATGGCTTGCCACATTACACG<br>(SEQ ID NO.3)    |
| R    | L    | GAATAAATCCKGCTATAATTGCAAATAC<br>(SEQ ID NO.4) |

[0020] 2. 斑潜蝇基因组 DNA 的提取

[0021] 本实验采用 Axygen 公司的 AxyPrep 基因组 DNA 小量试剂盒提取 3 种斑潜蝇基因组 DNA。该方法操作简单、快速、高效且无毒,提取的 DNA 的质量符合本研究的需要,具体操作步骤如下:

[0022] 1) 用镊子挑取浸渍在 100%乙醇中的单头斑潜蝇,用双蒸水充分洗涤两次后置于 1.5mL 离心管中;

[0023] 2) 加入 175  $\mu$ L Buffer PBS 和 0.45  $\mu$ L RNase A, 温和研磨 30s;

[0024] 3) 分别加入 75  $\mu$ L Buffer C-L 和 10  $\mu$ L Proteinase K,立即漩涡振荡 1min 混合均匀。短暂离心后将离心管置于 56°C 水浴 10min;

[0025] 4) 在水浴后产物中加入 175  $\mu$ L Buffer P-D,漩涡振荡 30s 混合均匀,12000rpm 离心 10min;

[0026] 5) 将 DNA 制备管置于 2mL 离心管中,将上述产物上清液移至制备管中,12000rpm 离心 1min;

[0027] 6) 弃滤液,将制备管置回原来的 2mL 离心管中,加入 250  $\mu$ L Buffer W1,12000rpm 离心 1min;

[0028] 7) 弃滤液,将制备管置回原来的 2mL 离心管中,加入 350  $\mu$ L Buffer W2,12000rpm 离心 1min;

[0029] 8) 以同样的方法,用 350  $\mu$ L Buffer W2 再洗涤一次;

[0030] 9) 弃滤液,将制备管置回原来的 2mL 离心管中,12000rpm 离心 1min;

[0031] 10) 将 DNA 制备管置于另一洁净的 1.5mL 离心管中,在制备管摸中央加 40  $\mu$ L Eluent,室温静置 1min,12000rpm 离心 1min 洗脱 DNA;

[0032] 11) 获得的基因组 DNA 保存在 -20°C 冰箱中备用。

[0033] 3. PCR 产物扩增

[0034] 表 2. 本发明中 25  $\mu$ l PCR 反应体系

[0035]

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| 10×buffer (+Mg <sup>2+</sup> ) | 5 μl    |
| dNTP(2.5mM)                    | 1μl     |
| 引物 Lt-F(10 μM)                 | 1μl     |
| 引物 Ls-F(10 μM)                 | 1μl     |
| 引物 Lh-F(10 μM)                 | 1μl     |
| 引物 L-R(10 μM)                  | 1μl     |
| Taq 酶 (5 μ/μl)                 | 0.5 μl  |
| DNA 模板(100 ng)                 | 2 μl    |
| 双蒸水                            | 12.5 μl |

[0036] 本发明中 25 μl PCR 反应体系如表 2, PCR 反应程序为 :94℃ 预变性 3 分钟, 94℃ 变性 1 分钟, 58℃ (T<sub>m</sub>) 退火 1 分钟, 72℃ 延伸 1 分钟, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 分钟。

#### [0037] 4. PCR 产物的电泳检测

[0038] 取 5 μL PCR 产物, 加 1 μL 左右上样缓冲液, 混合均匀。加样于 0.5×TBE 缓冲液配制的 1% 琼脂糖凝胶孔中, 点样后, 120V 恒压条件下电泳, 至溴酚兰接近胶板前缘, 停止电泳。将凝胶置于紫外透射仪中或凝胶成像系统中观察, 记录结果并拍照。

#### [0039] 5. 实验结果

[0040] 根据以上 4 条引物扩增的结果, 通过扩增出的产物的大小可以得出这样的结论 : 本发明引物组对三叶斑潜蝇扩增片段为 705bp (图 1, 泳道 1-3), 美洲斑潜蝇扩增片段为 1055bp (图 1, 泳道 4-6), 南美斑潜蝇扩增片段为 358bp (图 1, 泳道 7-9); 同时对三叶斑潜蝇各虫态的扩增稳定 (图 2)。

#### [0041] 6. 试剂盒的研制

[0042] 在利用斑潜蝇线粒体 COI 基因进行快速检测时, 四条引物对于我们来说是已知的, 而具体哪种斑潜蝇是未知的, 对于同一头斑潜蝇我们用 4 条引物同时进行多重 PCR 扩增, 可以按照各引物的扩增结果进行快速鉴定, 三叶斑潜蝇扩增片段为 705bp, 美洲斑潜蝇扩增片段为 1055bp, 南美斑潜蝇扩增片段为 358bp, 从而判断出具体的斑潜蝇种类, 形成一个快速有效的试剂盒, 为检疫部门提供一套快速灵敏的鉴定检测方法。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

- <110> 扬州大学
- <120> 用于快速鉴定三种斑潜蝇的特异性引物、试剂盒及检测方法
- <130>
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <400> 1  
caattacaat actattaaca gaccg 25
- <210> 2  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <400> 2  
agctccagac atagcatttc ctcg 24
- <210> 3  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <400> 3  
ttcagatggc ttgccacatt acacg 25
- <210> 4  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <400> 4  
gaataaatcc kgctataatt gcaaatac 28

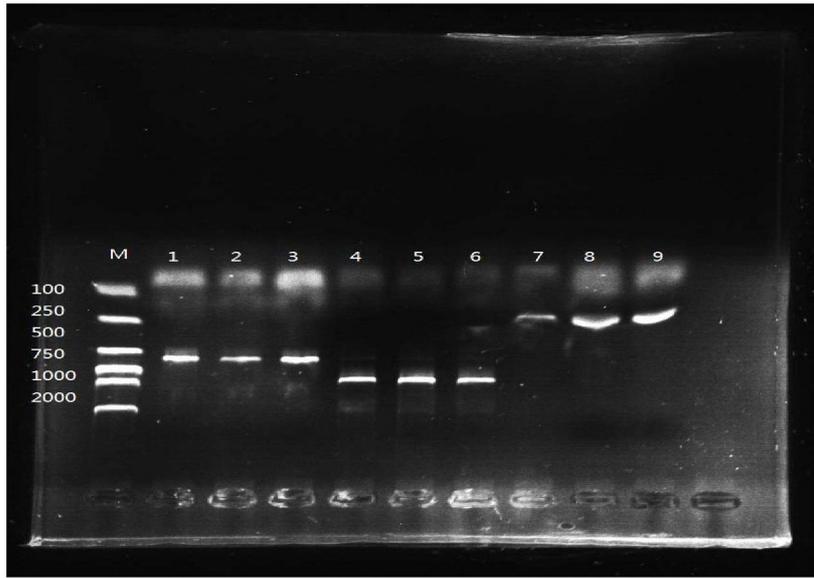


图 1

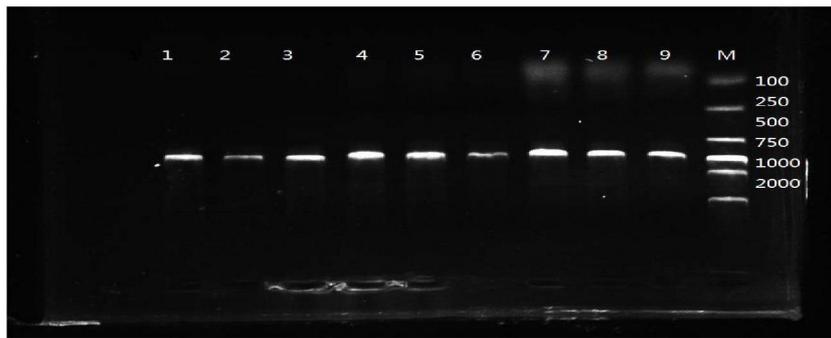


图 2