(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112852995 A
(43)申请公布日 2021.05.28

(21)申请号 202110282060.7

(22)申请日 2021.03.16

(71)申请人 中国农业科学院农产品加工研究所
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号中国农业科学院农产品加工研究所

(72)发明人 郭维 梁晓艳 张君

(74)专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332
代理人 巩克栋

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6895(2018.01)
C12Q 1/6844(2018.01)
C12Q 1/04(2006.01)
C12N 15/11(2006.01)
C12R 1/77(2006.01)

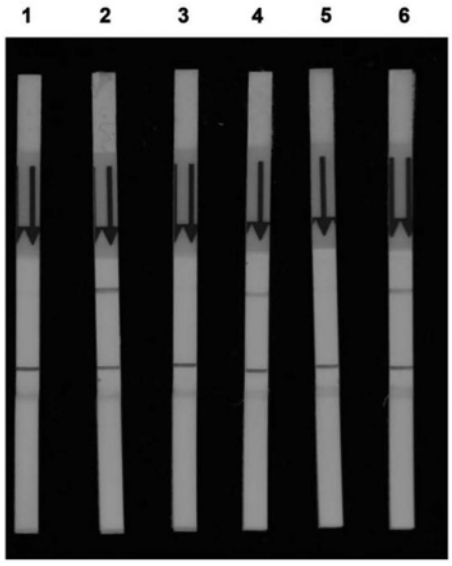
权利要求书2页 说明书7页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物、试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物、试剂盒及检测方法。所述引物探针组合物包括检测禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体物基因1～500bp序列的正向引物、反向引物和探针。所述引物探针组合物具备较高的特异性和灵敏度，能够实现对禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶基因的特异性扩增，且具备高灵敏度；所述检测方法既具备高特异性和灵敏度，又便于操作，能很好地满足对禾谷镰孢菌进行现场检测的要求。



CN 112852995 A

1.一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物,其特征在于,所述引物探针组合物包括检测禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体基因1～500bp序列的正向引物、反向引物和探针。

2.根据权利要求1所述的引物探针组合物,其特征在于,所述正向引物包括SEQ ID No.1所示的核苷酸序列;

优选地,所述反向引物包括SEQ ID No.2所示的核苷酸序列;

优选地,所述探针包括SEQ ID No.3所示的核苷酸序列;

优选地,所述反向引物的5'端修饰有生物素;

优选地,所述探针的5'端修饰有荧光基团;

优选地,所述荧光基团包括FAM;

优选地,所述探针的3'端修饰有间臂;

优选地,所述间臂包括C3-spacer;

优选地,所述探针的序列中距5'端31～36bp处修饰有四氢呋喃。

3.一种检测禾谷镰孢菌的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1或2所述的检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物;

优选地,所述试剂盒还包括重组酶聚合酶扩增酶组合物;

优选地,所述重组酶聚合酶扩增酶组合物包括recA重组酶、单链DNA结合蛋白、链置换DNA聚合酶和核酸内切酶IV;

优选地,所述试剂盒还包括缓冲液、无核酸酶水或醋酸镁中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述缓冲液包括补液缓冲液;

优选地,所述试剂盒还包括侧流层析试纸条。

4.如权利要求1或2所述的检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物和/或权利要求3所述的检测禾谷镰孢菌的试剂盒在检测禾谷镰孢菌中的应用。

5.一种检测禾谷镰孢菌的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1)提取待检测样品的基因组作为反应模板,采用权利要求1或2所述的检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物进行重组酶聚合酶扩增,得到扩增产物;

(2)使用侧流层析试纸条检测所述扩增产物,判断检测结果。

6.根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的反应体系包括100fg/μL～100ng/μL反应模板、0.4～0.45μM正向引物、0.4～0.45μM反向引物、0.05～0.15μM探针、体积百分比为59%～61%的缓冲液、体积百分比为24%～26%的无核酸酶水、11～17mM醋酸镁和0.1～0.3mg/μL重组酶聚合酶扩增酶组合物。

7.根据权利要求5或6所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的温度为37～42℃;

优选地,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的时间为20～30min。

8.根据权利要求5-7任一项所述的方法,其特征在于,步骤(2)所述检测包括将所述扩增产物与杂交检测缓冲液混合,得到混合液,将侧流层析试纸条的样品端放置于所述混合液中。

9.根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述扩增产物和杂交检测缓冲液的体积比为(0.03～0.07):1;

优选地,所述放置的时间为3～5min。

10.根据权利要求6-9任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

(1)提取待检测样品的基因组作为反应模板,配制反应体系:0.1～0.3μM反应模板、0.4～0.45μM正向引物、0.4～0.45μM反向引物、0.5～0.15μM探针、体积百分比为59%～61%的缓冲液、体积百分比为24%～26%的无核酸酶水、11～17mM醋酸镁和0.1mg/μL重组酶聚合酶扩增酶组合物,于37～42℃进行重组酶聚合酶扩增20～30min,得到反应后物料;

(2)按体积比为(0.03～0.07):1将所述扩增产物与杂交检测缓冲液混合,得到混合液,将侧流层析试纸条的样品端垂直放置于所述混合液中3～5min,判断检测结果。

一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物、试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物、试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 玉米是全球也是中国第一大作物，2019年我国玉米产量为26077万吨，占粮食总产量的39.28％。由禾谷镰孢菌(Fusarium graminearum)引起的玉米穗腐病(maize earrot)是玉米的主要穗部病害，不仅降低玉米产量，而且影响种子品质。除此之外，禾谷镰孢菌还能产生多种有毒的次生代谢产物(单端孢霉烯族化合物)，如脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol，DON)等。DON能引起动物的呕吐，且对人体有一定的危害作用，被国际癌症研究机构认定为三类致癌物。因此，检测饲用玉米中的禾谷镰孢菌对保护人畜安全至关重要。

[0003] 传统的镰孢菌分类鉴定主要基于形态学特征，根据菌落形态、分生孢子、分生孢子梗和分生孢子座等进行区分与鉴定，其在禾谷镰孢菌检测中发挥了重要作用，然而这种方法费时费力，要求操作者具备专业的镰孢菌形态学鉴定知识和丰富的实际经验；随着分子技术的发展，聚合酶链式反应(PCR)和实时荧光定量PCR(real-time PCR)已成功应用于禾谷镰孢菌的检测，但其检测周期较长，且依赖于PCR仪等精密仪器，不能满足快速检测的需求。

[0004] 环介导等温扩增反应(loop-mediated isothermal amplification，LAMP)方法能够实现禾谷镰孢菌的快速检测。

[0005] CN104313128A公开了一种基于环介导等温扩增技术检测禾谷镰孢菌的方法及引物组合物，所述的引物组合物在检测大豆禾谷镰孢菌中的应用，检测体系在62℃等温条件下，能高效、高特异、高灵敏地检测到大豆禾谷镰孢菌，但是反应需要在高温下进行，需要水浴锅或其它设备进行辅助。

[0006] 综上所述，建立一种更低的反应温度和更精简的仪器要求的检测方法，对于快速检测禾谷镰孢菌的方法开发领域具有重要意义。

发明内容

[0007] 针对现有技术的不足和实际需求，本发明提供一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物、试剂盒及检测方法，所述检测方法具备高特异性和灵敏度，且操作简便快捷，满足对禾谷镰孢菌进行现场检测的要求，可用于田间禾谷镰孢菌的早期诊断和病害监测。

[0008] 为达上述目的，本发明采用以下技术方案：

[0009] 第一方面，本发明提供一种检测禾谷镰孢菌(F.graminearum)的引物探针组合物，所述引物探针组合物包括检测禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体基因1～500bp序列的正向引物、反向引物和探针。

[0010] 本发明中的引物和探针具备较高的特异性和灵敏度，能够实现对禾谷镰孢菌的半

乳糖氧化酶前体基因的特异性扩增,且具备高灵敏度。

[0011] 优选地,所述正向引物包括SEQ ID No.1所示的核苷酸序列。

[0012] 优选地,所述反向引物包括SEQ ID No.2所示的核苷酸序列。

[0013] 优选地,所述探针包括SEQ ID No.3所示的核苷酸序列。

[0014] 优选地,所述反向引物的5'端修饰有生物素(Biotin)。

[0015] 优选地,所述探针的5'端修饰有荧光基团。

[0016] 优选地,所述荧光基团包括FAM。

[0017] 优选地,所述探针的3'端修饰有间臂。

[0018] 优选地,所述间臂包括C3-spacer。

[0019] 优选地,所述探针的序列中距5'端31～36bp(例如可以是32bp、33bp、34bp或35bp)处修饰有四氢呋喃(THF)。

[0020] SEQ ID No.1:

[0021] CGGAGGAACTGGAAGTCCTGAAGGGAGTCTT。

[0022] SEQ ID No.2:

[0023] Biotin-TTTGTGCCATCTGAGCTTAGATAAACCTCA。

[0024] SEQ ID No.3:

[0025] FAM-CACATTCTATGGGGCCAATGGAGATCCAAAGCC-THF-CCTCAC ACATACAC-C3spacer。

[0026] 本发明中,利用上述引物和探针能够进行重组酶聚合酶扩增反应(Recombinase polymerase amplification,RPA),探针5'端带有羧基荧光素(FAM)标记,3'端带有C3-spacer,反向引物5'端带有Biotin,RPA反应体系中核酸内切酶IV(Nfo酶)可以特异性地识别并切割探针序列中的THF分子,剪切后的探针与下游引物可扩增得到既带有FAM标记也带有Biotin的双标记扩增子。

[0027] 第二方面,本发明提供一种检测禾谷镰孢菌的试剂盒,所述试剂盒包括第一方面所述的检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物。

[0028] 优选地,所述试剂盒还包括重组酶聚合酶扩增酶组合物。

[0029] 优选地,所述重组酶聚合酶扩增酶组合物包括recA重组酶、单链DNA结合蛋白、链置换DNA聚合酶和核酸内切酶IV(Nfo酶)。

[0030] 优选地,所述试剂盒还包括缓冲液、无核酸酶水(Nuclease-Free Water)或醋酸镁中的任意一种或至少两种的组合。

[0031] 优选地,所述缓冲液包括补液缓冲液(Rehydration Buffer)。

[0032] 优选地,所述试剂盒还包括侧流层析试纸条。

[0033] 本发明中,利用所述引物和探针能够进行高特异性RPA反应,获得禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体基因既带有FAM标记也带有Biotin的双标记扩增子,所述扩增子能够和侧流层析试纸条的检测线上的Biotin配体结合,从而使检测线显色,实现检测禾谷镰孢菌的目的。

[0034] 第三方面,本发明提供如第一方面所述的检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物和/或第二方面所述的检测禾谷镰孢菌的试剂盒在检测禾谷镰孢菌中的应用。

[0035] 第四方面,本发明提供一种检测禾谷镰孢菌的方法,所述方法包括以下步骤:

[0036] (1)提取待检测样品的基因组作为反应模板,采用第一方面所述的检测禾谷镰孢

菌的引物探针组合物进行重组酶聚合酶扩增,得到扩增产物;

[0037] (2)使用侧流层析试纸条检测所述扩增产物,判断检测结果。

[0038] 本发明中,利用所述引物和探针能够进行高特异性RPA反应,获得禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体基因既带有FAM标记也带有Biotin的双标记扩增子,所述扩增子能够和侧流层析试纸条的检测线上的Biotin配体结合,从而使检测线显色,实现检测禾谷镰孢菌的目的,此外,RPA反应可在37～42℃条件下快速将核酸扩增至可检测水平,因此,本发明的检测方法既具备高特异性和灵敏度,又便于操作,能很好地满足对禾谷镰孢菌进行现场检测的要求。

[0039] 优选地,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的反应体系包括100fg/μL～100ng/μL反应模板(例如可以为1pg/μL、10pg/μL、100pg/μL、1ng/μL、10ng/μL、40ng/μL、70ng/μL或90ng/μL)、0.4～0.45μM正向引物(例如可以为0.41μM、0.42μM、0.43μM或0.44μM)、0.4～0.45μM反向引物(例如可以为0.41μM、0.42μM、0.43μM或0.44μM)、0.05～0.15μM探针(例如可以为0.06μM、0.07μM、0.08μM、0.09μM、0.12μM或0.14μM)、体积百分比为59%～61%的缓冲液(例如可以是59.2%、59.4%、59.6%、59.8%、60%、60.2%、60.4%、60.5%或60.8%)、体积百分比为24%～26%的无核酸酶水(例如可以是24.2%、24.6%、24.8%、25%、25.2%、25.6%或25.8%)、11～17mM醋酸镁(例如可以是12mM、13mM、14mM、15mM或16mM)和0.1～0.3mg/μL重组酶聚合酶扩增酶组合物。

[0040] 优选地,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的反应体系包括1μL 100ng/μL的反应模板、2.1μL 10μM的正向引物、2.1μL 10μM的反向引物、0.6μL 10μM的探针、29.5μL Rehydration Buffer、12.2μL Nuclease-Free Water、2.5μL 280mM的醋酸镁和5mg重组酶聚合酶扩增酶组合物。

[0041] 优选地,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的温度为37～42℃,包括但不限于38℃、39℃、40℃或41℃。

[0042] 优选地,步骤(1)所述重组酶聚合酶扩增的时间为20～30min,包括但不限于21min、22min、24min、25min、26min、27min或28min。

[0043] 优选地,步骤(2)所述检测包括将所述扩增产物与杂交检测缓冲液(HybriDetect assaybuffer)混合,得到混合液,将侧流层析试纸条的样品端放置于所述混合液中。

[0044] 优选地,所述扩增产物和HybriDetect assaybuffer的体积比为(0.03～0.07):1,包括但不限于0.04:1、0.05:1或0.06:1。

[0045] 优选地,所述放置的时间为3～5min。

[0046] 作为优选的技术方案,所述检测禾谷镰孢菌的方法包括以下步骤:

[0047] (1)提取待检测样品的基因组作为反应模板,配制反应体系:0.1～0.3μM反应模板、0.4～0.45μM正向引物、0.4～0.45μM反向引物、0.5～0.15μM探针、体积百分比为59%～61%的缓冲液、体积百分比为24%～26%的无核酸酶水、11～17mM醋酸镁和0.1～0.3mg/μL重组酶聚合酶扩增酶组合物,于37～42℃进行重组酶聚合酶扩增20～30min,得到反应后物料;

[0048] (2)按体积比为(0.03～0.07):1将所述扩增产物与HybriDetect assay buffer混合,得到混合液,将侧流层析试纸条的样品端垂直放置于述混合液中3～5min,判断检测结果。

[0049] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

[0050] (1)本发明中的引物和探针具备较高的特异性和灵敏度，能够实现对禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体基因的特异性扩增，且具备高灵敏度；

[0051] (2)本发明的检测方法利用所述引物和探针能够进行高特异性RPA反应，获得禾谷镰孢菌的半乳糖氧化酶前体基因既带有FAM标记也带有Biotin的双标记扩增子，此外，RPA反应可在37～42℃条件下快速将核酸扩增至可检测水平，因此，本发明的检测方法既具备高特异性和灵敏度，又便于操作，能很好地满足对禾谷镰孢菌进行现场检测的要求；

[0052] (3)本发明的检测方法能够特异性地检测禾谷镰孢菌，且灵敏度高，最低能够检测浓度为100fg/μL基因组模板，且能有效检测玉米中的禾谷镰孢菌。

附图说明

[0053] 图1为禾谷镰孢菌的RPA引物筛选结果，其中，M为DNAmarker，1-4为引物组合物1对禾谷镰孢菌、拟轮枝镰孢菌、层出镰孢菌以及尖孢镰孢菌的扩增结果，5-8为引物组合物2对禾谷镰孢菌、拟轮枝镰孢菌、层出镰孢菌以及尖孢镰孢菌的扩增结果，9-12为引物组合物3对禾谷镰孢菌、拟轮枝镰孢菌、层出镰孢菌以及尖孢镰孢菌的扩增结果；

[0054] 图2为禾谷镰孢菌的检测特异性结果，其中，1为阳性对照菌株F.graminearum PH-1；2和3为从内蒙古自治区分离到的F.graminearum；4为从辽宁省分离到的F.graminearum；5和6为从山东省分离到的F.graminearum；7和8为从河南省分离到的F.graminearum；9和10为从上海市分离到的F.graminearum，11为从云南省分离到的F.graminearum；12为F.verticillioides；13为F.oxysporum；14为F.proliferatum；15为F.fujikuroi；16为Nigrospora sp.；17为Rhizomucor variabilis；18为Phoma sp.；

[0055] 图3为禾谷镰孢菌检测的灵敏度验证结果，扩增不同浓度禾谷镰孢菌的基因组DNA，从左至右浓度分别为：100ng/μL、10ng/μL、1ng/μL、100pg/μL、10pg/μL、1pg/μL、100fg/μL和10fg/μL；

[0056] 图4为玉米籽粒接种2天后症状；

[0057] 图5为玉米茎秆接种5天后症状；

[0058] 图6为人工接种玉米籽粒及茎秆的检测结果，其中，1为以水为模板的检测结果(阴性对照)；2为以100ng/μLF.graminearum PH-1基因组为模板的检测结果(阳性对照)；3为以接种水的玉米籽粒基因组为模板的检测结果；4为以接种F.graminearum PH-1的玉米籽粒为模板的检测结果；5为以接种水的玉米茎秆基因组为模板的检测结果；6为以接种F.graminearum PH-1的玉米茎秆基因组为模板的检测结果。

具体实施方式

[0059] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果，以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是，此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明，而非对本发明的限定。

[0060] 实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件，或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0061] 本发明实施例中,Rehydration Buffer、醋酸镁及酶干粉组合物购买于TwistDx公司,Nuclease-Free Water购买于ThermoFisher Scientific公司,HybriDetect assaybuffer和侧流层析试纸条购买于MileniaBiotec GmbH。

[0062] 实施例1

[0063] 基于生物信息学分析工具,以禾谷镰孢菌(F.graminearum)的半乳糖氧化酶基因(gaoA)作为检测靶标,从NCBI数据库下载禾谷镰孢菌以及其余4种镰孢菌的gaoA序列,通过多序列比对分析,在禾谷镰孢菌和其它镰孢菌有明显序列差异的区域设计特异性的引物组合物,并从设计的引物组合物中初步选择了3组引物组合物,引物组合物1:F1(SEQ ID No.1:CGGAGGAACTGGAAGTCCTGAAGGGAGTCTT),R1(SEQ ID No.2:TTTGTGCCATCTGAGCTTAGATAAACCTCA);引物组合2:F2(SEQ ID No.4:CTCTGTTGTTCTTCCAGACGGAAGCACGTTTATTA),R2(SEQ ID No.5:CTGGTCAGTATTAACCGTGTGTGTCGCTGTACCAT),引物组合3:F3(SEQ ID No.6:AGATGGCACAAACTGGGGCAGCCCTGTTGCGTCA),R3(SEQ ID No.7:AGCGGCCAAGGCCAGGCTGAGGGGCTGTGTAA)。

[0064] 通过普通PCR扩增筛选特异性强的引物组合物,图1表明只有引物组合物1能够实现对禾谷镰孢菌的特异性扩增且满足RPA实验对扩增产物100～300bp的要求,采取引物组合物1用于后续的禾谷镰孢菌的重组酶聚合酶扩增,F1即为本发明所述的正向引物,R1即本发明所述的反向引物,并根据探针设计原则设计探针(SEQ ID No.3:FAM-CACATTCTATGGGGCCAATGGAGATCCAAAGCC-THF-CCTCACACATACAC-C3spacer)。

[0065] 实施例2

[0066] 对F.graminearum PH-1以及从内蒙古自治区、辽宁省、山东省、河南省、上海市、云南省分离得到的F.graminearum进行检测,以其它4种亲缘关系较近或者复合侵染的菌株(F.verticillioides,F.proliferatum,F.oxysporum,F.fujikuroi)和非镰孢菌(Phoma sp.,Rhizomucor variabilis,Nigrospora sp.)作为对照菌株,评估特异性。

[0067] 采用正向引物(SEQ ID No.1)、反向引物(SEQ ID No.2)和探针(SEQ ID No.3)制备试剂盒,该试剂盒还包括Rehydration Buffer、无核酸酶水(Nuclease-Free Water)、醋酸镁、重组酶聚合酶扩增酶组合物(含有recA重组酶、单链DNA结合蛋白、链置换DNA聚合酶和核酸内切酶IV)和侧流层析试纸条,其中,正向引物、反向引物和探针的浓度均为10μM和醋酸镁浓度为280mM。

[0068] 提取上述待检测菌株的基因组,取1μL基因组作为反应模板,进行RPA反应,进行两次平行试验,反应体系如表1所示,反应程序为:40℃反应扩增25min,取5μL扩增产物与95μL的HybriDetect assaybuffer混合,将侧流层析试纸条样品端垂直浸入混合液中,室温放置3min后判断检测结果,如图2所示。

[0069] 表1

[0070]

试剂	用量
RehydrationBuffer	29.5μL
Nuclease-FreeWater	12.2μL
正向引物	2.1μL
反向引物	2.1μL
探针	0.6μL

基因组	1μL
重组酶聚合酶扩增酶组合物	5mg
醋酸镁	2.5μL

[0071] 由图2可知,1为阳性对照菌株F.graminearum PH-1;2和3为从内蒙古自治区分离到的F.graminearum;4为从辽宁省分离到的F.graminearum;5和6为从山东省分离到的F.graminearum;7和8为从河南省分离到的F.graminearum;9和10为从上海市分离到的F.graminearum,11为从云南省分离到的F.graminearum;12为F.verticillioides;13为F.oxysporum;14为F.proliferatum;15为F.fujikuroi;16为Nigrospora sp.;17为Rhizomucor variabilis;18为Phoma sp.,其中,只有禾谷镰孢菌(1～11)的检测线和控制线上都出现指示带,表示阳性检测结果,而其它病原真菌的检测线没有出现指示带,表示阴性检测结果,表明本发明的引物探针组合物对于禾谷镰孢菌具备较高的特异性。

[0072] 实施例3

[0073] 将F.graminearum PH-1的基因组用分光光度计测定浓度后进行10倍梯度稀释,设置DNA浓度范围为10fg/μL～100ng/μL(100ng/μL、10ng/μL、1ng/μL、100pg/μL、10pg/μL、1pg/μL、100fg/μL和10fg/μL),分别取1μL稀释后的各浓度DNA稀释液作为模板,按实施例2所述的反应体系和条件进行RPA反应及检测,根据检测线指示带颜色变化,判断检测结果,结果如图3所示。

[0074] 由图3可知,DNA浓度在100fg/μL～100ng/μL的范围都可以观察到试纸条检测线处有条带,DNA浓度为10fg/μL试纸条检测线没有条带,说明当镰孢菌DNA浓度为100fg/μL时就足以满足检测要求,表明本发明的检测方法具备高灵敏度。

[0075] 实施例4

[0076] 本实施例以玉米为例,检测玉米中禾谷镰孢菌。

[0077] 待测样品为B73玉米籽粒和B73玉米茎秆,向其中分别人工接种F.graminearum PH-1,以接种等量水为对照(control),图4为玉米籽粒接种2天后症状,图5为玉米茎秆接种5天后症状,采用新型植物基因组DNA提取试剂盒(天根)按说明书提取基因组,根据实施例2所述方法进行RPA反应及检测,同时以纯水和F.graminearum PH-1基因组为模板进行检测作为对照,结果如图6所示。

[0078] 由图6可知,其中,1为以水为模板的检测结果(阴性对照);2为以100ng/μL F.graminearumPH-1基因组为模板的检测结果(阳性对照);3为以接种水的玉米籽粒基因组为模板的检测结果;4为以接种F.graminearum PH-1的玉米籽粒为模板的检测结果;5为以接种水的玉米茎秆基因组为模板的检测结果;6为以接种F.graminearum PH-1的玉米茎秆基因组为模板的检测结果。结果表明,接种禾谷镰孢菌的玉米籽粒和茎秆均呈阳性结果,而未接种禾谷镰孢菌的玉米籽粒和茎秆样品呈阴性,表明本发明提供的方法能够快速准确地检测出玉米中禾谷镰孢菌。

[0079] 综上所述,本发明的检测方法具有特异性强、准确性高、操作简单以及不需要PCR仪等昂贵设备的特点,能够实现现场快速检测玉米中是否携带致病禾谷镰孢菌,易于大规模推广应用。

[0080] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的

技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

SEQUENCE LISTING
<110> 中国农业科学院农产品加工研究所
<120> 一种检测禾谷镰孢菌的引物探针组合物、试剂盒及检测方法
<130> 20210312
<160> 7
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 1
cggaggaact ggaagtcctg aagggagtct t 31
<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 2
tttgtgccat ctgagcttag ataaacctca 30
<210> 3
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 3
cacattctat ggggccaatg gagatccaaa gcccctcaca catacac 47
<210> 4
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 4
ctctgttgtt cttccagacg gaagcacgtt tatta 35
<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<400> 5
ctggtcagta ttaaccgtgt gtgtcgctgt accat 35
<210> 6
<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

agatggcaca aactggggca gccctgttgc gtca 34

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

agcggccaag gccaggctga ggggctgtgt aa 32

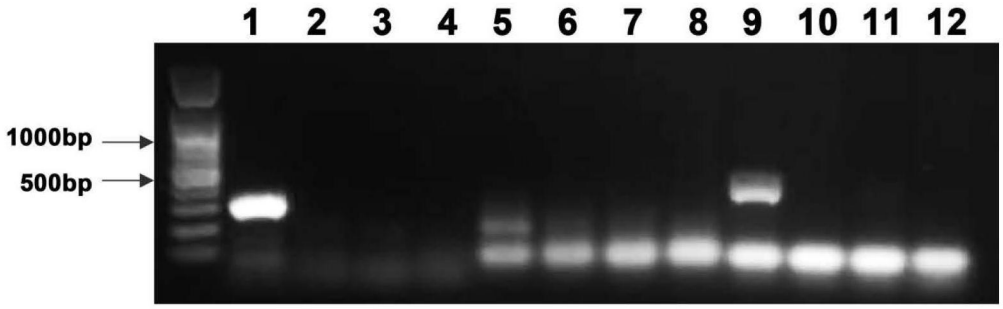

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
1000bp
500bp

图1

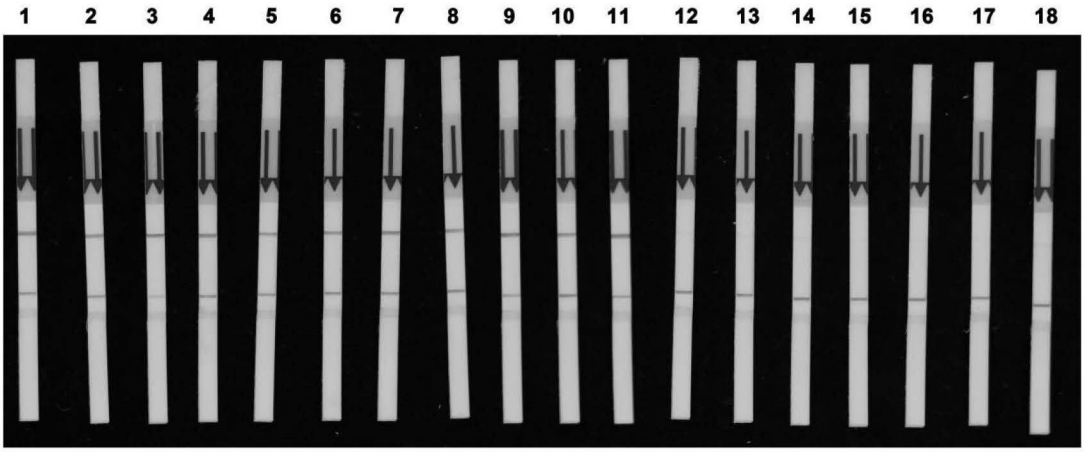

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

图2

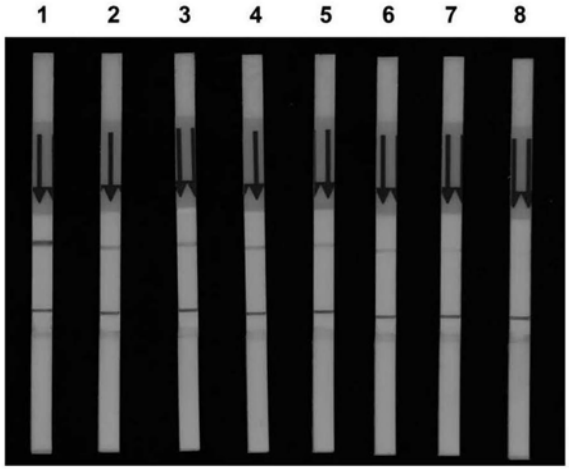

1 2 3 4 5 6 7 8

图3

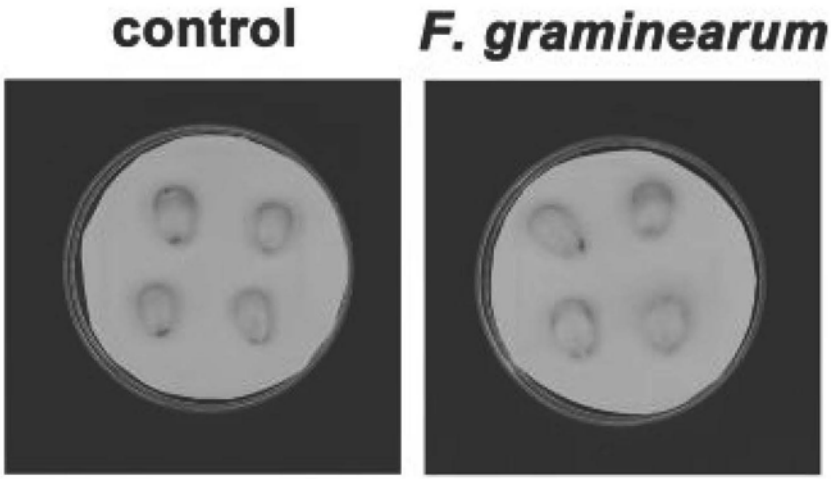


图4

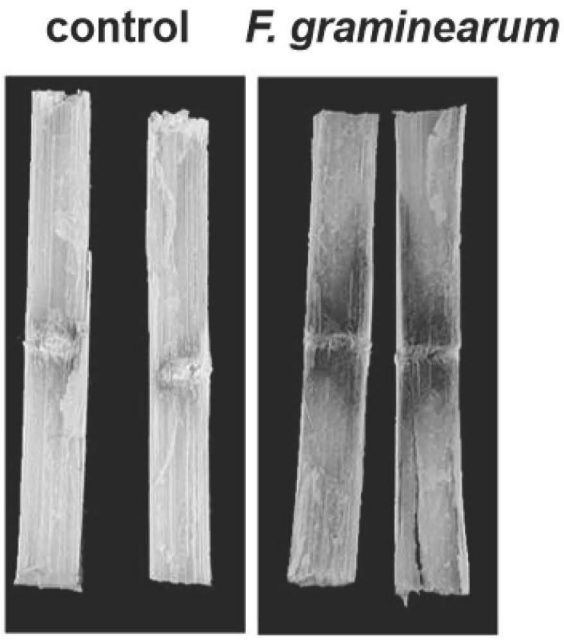


图5

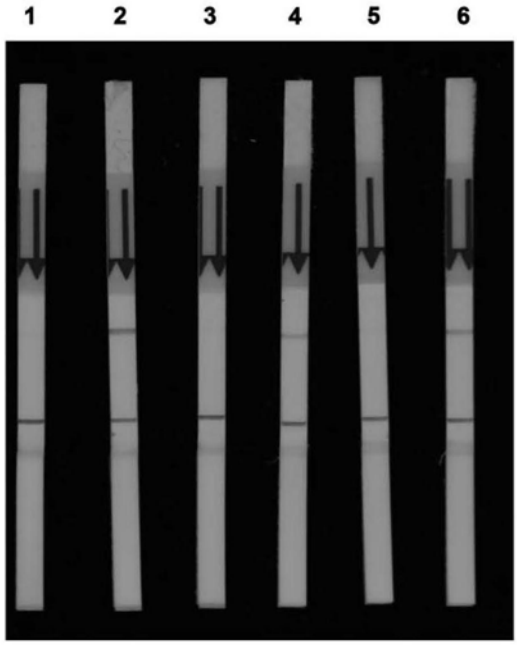


图6