



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113308552 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 202110650724.0

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.10

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 111269968 A, 2020.06.12

申请公布号 CN 113308552 A

审查员 陈丹

(43) 申请公布日 2021.08.27

(73) 专利权人 四川大学

地址 610065 四川省成都市一环路南一段  
24号

(72) 发明人 岳碧松 王磊 张雪莲

(74) 专利代理机构 成都知棋知识产权代理事务  
所(普通合伙) 51325

专利代理师 马超前

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

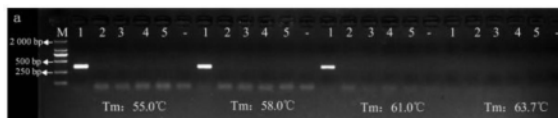
权利要求书1页 说明书7页  
序列表2页 附图3页

## (54) 发明名称

一种草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒  
和鉴别方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒和鉴别方法,该草地贪夜蛾种特异性引物对的核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。本发明基于线粒体DNA COI基因开发的草地贪夜蛾的种特异性引物,利用草地贪夜蛾、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟5种鳞翅目昆虫对草地贪夜蛾的种特异性引物对进行种特异性检验,进一步建立种特异性引物与线粒体COI基因通用引物的多重PCR反应体系,以COI通用引物的扩增产物作为PCR反应的内对照,用于检测所检测材料中是否存在可供检测的DNA,为草地贪夜蛾的快速识别与疫情监控提供技术手段。



1. 一种采用核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物对及核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA COI通用引物对检测草地贪夜蛾的试剂盒,其特征在于,在斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟中鉴定出草地贪夜蛾;其中,所述种特异性引物对和线粒体DNA COI通用引物对的浓度比为1:2,核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物的浓度均为10  $\mu\text{M}$ ,用量均为0.4  $\mu\text{L}$ ;核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA COI通用引物的浓度均为10  $\mu\text{M}$ ,用量均为0.8  $\mu\text{L}$ ;多重PCR反应的退火温度 $T_m$ 为56.5~59.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 一种基于多重PCR鉴别草地贪夜蛾的方法,其特征在于,该方法采用核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物对及核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA COI通用引物对进行多重PCR反应,若扩增得到349 bp和COI 目的条带的扩增产物,则待测昆虫为草地贪夜蛾;该方法用于在斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟中鉴定出草地贪夜蛾;

其中,所述种特异性引物对和线粒体DNA COI通用引物对的浓度比为1:2,核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物的浓度均为10  $\mu\text{M}$ ,用量均为0.4  $\mu\text{L}$ ;核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA COI通用引物的浓度均为10  $\mu\text{M}$ ,用量均为0.8  $\mu\text{L}$ ;多重PCR反应的退火温度 $T_m$ 为56.5~59.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,该方法的多重PCR反应体系的成分包含:Taq DNA Polymerase、10 $\times$ Taq Buffer、dNTPs、核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物对、核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA COI通用引物对、待测昆虫的DNA基因组、 $\text{ddH}_2\text{O}$ 。

## 一种草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒和鉴别方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种昆虫鉴别方法,具体涉及一种草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒和鉴别方法。

### 背景技术

[0002] 草地贪夜蛾*Spodoptera frugiperda*是一种世界性的重大农业害虫,作为入侵种对我国的粮食安全和生态安全构成严重威胁,因此对草地贪夜蛾进行快速准确的识别鉴定是草地贪夜蛾综合防控、保障农林业安全和生态环境安全的必要前提。

[0003] 国内田间调查发现草地贪夜蛾常与斜纹夜蛾*Spodoptera litura*、甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*、粘虫*Mythimna separata*等鳞翅目昆虫混合发生,形态特征和为害特点均较为相似,经验缺乏者仅从形态上难以进行区分,同时传统的形态学鉴定方法易被虫态(如卵、幼虫、蛹)、残体、亚群、性别等影响,加大草地贪夜蛾快速准确鉴定的难度。基于目前存在的问题,亟待开发特定的分子鉴定技术,补偿传统形态学鉴定的局限,提高物种鉴定的准确性和时效性。

[0004] 2003年,Hebert等提出基于线粒体DNA CO I基因的DNA条形码(DNA barcoding)对生物进行物种鉴定,该技术不受虫态、虫体完整性、性别等局限,且易操作实施、重复性好,已在昆虫纲的种类鉴定中得到广泛应用,包括鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目等31个目。2019年,张磊等利用线粒体DNA CO I基因对入侵云南的草地贪夜蛾进行分子鉴定,然而该方法需要进行大量的测序、序列比对及构建系统进化树等,步骤繁琐、耗时长。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒和鉴别方法,建立种特异性引物与线粒体CO I基因通用引物的多重PCR反应体系,以CO I通用引物的扩增产物作为PCR反应的内对照,用于检测所检测材料中是否存在可供检测的DNA,为草地贪夜蛾的快速识别与疫情监控提供技术手段。

[0006] 为了达到上述目的,本发明提供了一种草地贪夜蛾种特异性引物对,该引物对的核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示。

[0007] 本发明的另一目的是提供一种用于鉴别草地贪夜蛾的种特异序列,该种特异序列如SEQ ID NO.5所示。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种采用核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物对检测草地贪夜蛾的试剂盒。

[0009] 优选地,该试剂盒中还包含核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA CO I通用引物对。

[0010] 本发明的另一目的是提供一种基于多重PCR鉴别草地贪夜蛾的方法,该方法采用核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物对及核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA CO I通用引物对进行多重PCR反应,若扩增得到

349bp和750bp的扩增产物,则待测昆虫为草地贪夜蛾。

[0011] 优选地,该方法的多重PCR反应体系的成分包含:Taq DNA Polymerase、10×Taq Buffer、dNTPs、核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物对、核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA CO I通用引物对、待测昆虫的DNA基因组、ddH<sub>2</sub>O。

[0012] 优选地,所述种特异性引物对和线粒体DNA CO I通用引物对的浓度比为1:2。

[0013] 优选地,核苷酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的种特异性引物的浓度均为10μM,用量均为0.4μL;核苷酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的线粒体DNA CO I通用引物的浓度均为10μM,用量均为0.8μL。

[0014] 优选地,多重PCR反应的退火温度T<sub>m</sub>为56.5~59.5℃。

[0015] 优选地,在多重PCR反应的退火温度T<sub>m</sub>为56.5℃时,所述待测昆虫的DNA基因组的浓度大于1.56ng/μL;在多重PCR反应的退火温度T<sub>m</sub>为59.5℃时,所述待测昆虫的DNA基因组的浓度大于12.5ng/μL。

[0016] 本发明的草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒和鉴别方法,具有以下优点:

[0017] 本发明基于线粒体DNA CO I基因开发草地贪夜蛾的种特异性引物,利用草地贪夜蛾、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟5个物种对草地贪夜蛾的种特异性引物进行种特异性检验,进一步建立种特异性引物与线粒体CO I基因通用引物的多重PCR反应体系,以CO I通用引物的扩增产物作为PCR反应的内对照,用于监测所检测材料中是否存在可供检测的DNA,为草地贪夜蛾的快速识别与疫情监控提供技术手段。

[0018] 本发明的鉴别方法,仅使用种特异性引物,在56.5-62.5℃下均能在斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟中鉴定出草地贪夜蛾DNA。为了保证鉴定结果的可靠性,本发明的方法使用种特异性引物和线粒体CO I通用引物LC01490/HCO2198的多重PCR反应体系来鉴定草地贪夜蛾,退火温度T<sub>m</sub>控制在56.5~59.5℃,种特异性引物Spf-F/Spf-R和LC01490/HCO21982对引物的比例控制在1:2左右,并且根据退火温度选择DNA用量,保证了扩增条带明显。将扩增获得的种特异性产物序列(349bp)进行同源性比对,结果显示没有同属(Spodoptera)近缘物种如斜纹夜蛾*Spodoptera litura*或其他蛾类昆虫的与草地贪夜蛾的该种特异性序列完全一致,表明该检测技术体系完全可以用于草地贪夜蛾的监测、口岸检疫或寄主植物等种苗和植株中的草地贪夜蛾进行快速鉴定。

## 附图说明

[0019] 图1为基于通用引物LC01490/HCO2198对5种鳞翅目昆虫线粒体DNA CO I序列的扩增结果。

[0020] 图2为本发明的种特异性引物PCR条件的初次优化结果。

[0021] 图3为本发明的种特异性引物PCR条件的二次优化结果。

[0022] 图4为本发明的种特异性引物和通用CO I引物在退火温度56.5℃的多重PCR结果。

[0023] 图5为本发明的种特异性引物和通用CO I引物在退火温度58.0℃的多重PCR结果。

[0024] 图6为本发明的种特异性引物和通用CO I引物在退火温度59.5℃的多重PCR结果。

[0025] 图7为本发明的种特异性引物和通用CO I引物在退火温度61.0℃的多重PCR结果。

[0026] 图8为本发明的种特异性引物和通用CO I引物在退火温度62.5℃的多重PCR结果。

[0027] 图9为本发明的特定多重PCR体系对不同浓度样本DNA在退火温度56.5℃的检测结果。

[0028] 图10为本发明的特定多重PCR体系对不同浓度样本DNA在退火温度59.5℃的检测结果。

### 具体实施方式

[0029] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0030] 以下实验例所使用的材料如下:

[0031] 1、供试虫源

[0032] 利用的5种昆虫具体信息见表1,样本均浸泡于无水乙醇,保存于-20℃。

[0033] 表1为5种昆虫的基本信息

	种	属	科	来源	时间
	草地贪夜蛾	灰翅夜蛾属	夜蛾科	凉山州盐源县	2020.06
[0034]	斜纹夜蛾	灰翅夜蛾属	夜蛾科	植保所人工饲养	2020.06
	甜菜夜蛾	灰翅夜蛾属	夜蛾科	济源白云公司	2020.06
	粘虫	秘夜蛾属	夜蛾科	济源白云公司	2020.06
	玉米螟	秆野螟属	螟蛾科	植保所人工饲养	2020.06

[0035] 注:草地贪夜蛾:Spodoptera frugiperda;斜纹夜蛾:Spodoptera litura;甜菜夜蛾:Spodoptera exigua;粘虫:Mythimna separata;玉米螟:Ostrinia furnacalis;灰翅夜蛾属:Spodoptera;秘夜蛾属:Mythimna;秆野螟属:Ostrinia;夜蛾科:Noctuidae;螟蛾科:Pyralidae。

[0036] 2、主要实验试剂

[0037] 无水乙醇,购自成都长联化工试剂有限公司;DNA提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit,血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒),购自天根生化科技(北京)有限公司;Agarose琼脂糖,购自北京擎科新业生物技术有限公司;50×TAE,购自Beijing Solarbio Science&Technology CO.,Ltd;Taq DNA Polymerase,Innovagene;dNTP Mixture (2.5mM),Innovagene;DL2000DNA Marker,购自北京擎科新业生物技术有限公司;核酸染液Gelview,购自北京百泰克生物技术有限公司。

[0038] 实验例1昆虫样本DNA的提取、质量评估与鉴定

[0039] 1、昆虫样本DNA的提取及质量评估

[0040] 利用TIANamp Genomic DNA Kit,按照试剂盒的说明书稍作改进后提取5种昆虫的总基因组DNA。利用紫外分光光度计检测5种昆虫的DNA浓度,分别稀释为浓度50ng/μL DNA标准溶液,利用线粒体DNA CO I通用引物(LC01490/HCO2198)扩增CO I序列来评估DNA的质

量,CO I序列的PCR反应总体系为25 $\mu$ L,并将PCR产物送至北京擎科新业生物技术有限公司(成都分公司)双向测序进行物种的分子鉴定。

[0041] 表2为CO I序列的PCR反应总体系的成分

	成分	用量 ( $\mu$ L)
	Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0.5
	10 $\times$ Taq Buffer	2.5
[0042]	dNTP Mixture (2.5 mM)	2.0
	LCO1490 (正引物) (10 $\mu$ M)	1.0
	HCO2198 (反引物) (10 $\mu$ M)	1.0
	模板 DNA (50 ng/ $\mu$ L)	1.0
	ddH <sub>2</sub> O	17.0

[0043] 线粒体DNA CO I通用引物LCO1490和HCO2198的具体序列如下:

[0044] LCO1490:5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' (SEQ ID NO.1);

[0045] HCO2198:5' -TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (SEQ ID NO.2)。

[0046] CO I序列的PCR扩增程序步骤,为:首先94 $^{\circ}$ C预变性5min,然后进行35个循环:94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 40s,最后72 $^{\circ}$ C延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0047] 2、鉴定结果

[0048] 上述CO I通用引物能成功扩增草地贪夜蛾及其他4种昆虫的线粒体DNA CO I序列(参见图1),经测序均成功进行核酸序列分子鉴定,因此样本DNA可以用于后续实验。

[0049] 实验例2草地贪夜蛾种特异性引物的设计

[0050] 从NCBI下载草地贪夜蛾、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟线粒体DNA CO I的完整序列,其线粒体全序列的序列号分别为:NC\_027836.1、NC\_022676.1、NC\_019622.1、NC\_023118.1和NC\_003368.1。利用MEGA version 5.2进行多序列比对,在线粒体DNA CO I基因的保守区域选取草地贪夜蛾与另外4个物种差异较大的区域设计草地贪夜蛾的种特异性引物,设计的引物对Spf-F/Spf-R具体如下:

[0051] Spf-F(正向引物):5' -CTCAAATCAATTATTCCTCCA-3' (SEQ ID NO.3);

[0052] Spf-R(反向引物):5' -AGAATCAGGATAATCAGAATATCG-3' (SEQ ID NO.4)。

[0053] 实验例3草地贪夜蛾种特异性引物的种特异性检测

[0054] 1、种特异性引物PCR条件的优化

[0055] 分别以草地贪夜蛾、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟的DNA标准溶液作为模板,ddH<sub>2</sub>O作为阴性对照,优化草地贪夜蛾种特异性引物Spf-F/Spf-R的PCR条件,包括PCR退火温度T<sub>m</sub>值、引物用量、DNA用量、延伸时间、循环次数等条件,取4 $\mu$ L PCR产物利用浓度2.5%琼脂糖凝胶电泳检测,预期目标产物349bp,电泳时间13min,电压120V,电流400mA。PCR反应总体系为25 $\mu$ L。

[0056] 表3为种特异性引物PCR反应总体系的成分

	成分	用量 ( $\mu\text{L}$ )
	Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5
	10×Taq Buffer	2.5
[0057]	dNTP Mixture (2.5 mM)	2.0
	Spf-F (10 $\mu\text{M}$ )	0.4
	Spf-R (10 $\mu\text{M}$ )	0.4
	模板 DNA (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	1.0
[0058]	ddH <sub>2</sub> O	18.2

[0059] 种特异性引物PCR扩增程序的具体步骤,为:首先94℃预变性5min,然后进行35个循环:94℃30s,55.0-63.7℃(需优化)30s,72℃20s,最后72℃延伸5min,4℃保存。

[0060] PCR扩增的产物序列如SEQ ID NO.5所示。将扩增获得的种特异性产物序列(349bp)进行同源性比对,结果显示没有同属(Spodoptera)近缘物种如斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*或其他蛾类昆虫的与草地贪夜蛾的该种特异性序列完全一致,表明该检测技术体系完全可以用于草地贪夜蛾的监测、口岸检疫或寄主植物等种苗和植株中对草地贪夜蛾进行快速鉴定。

[0061] 2、优化结果

[0062] 设置4个退火温度(55.0℃、58.0℃、61.0℃、63.7℃)对种特异性引物Spf-F/Spf-R进行PCR  $T_m$ 值进行初步优化。实验结果表明,在58.0-61.0℃之间均只有草地贪夜蛾DNA能成功扩增目的条带,为349bp,且扩增条带较亮;在55.0℃时,除草地贪夜蛾DNA成功扩增外,斜纹夜蛾DNA有较弱的扩增条带,其余3个物种均未出现扩增条带;在63.7℃时,5个物种均未成功扩增出目的条带(参见图2,为初步优化)。

[0063] 根据初步优化结果分别在55.0℃与58.0℃、58.0℃与61.0℃、61.0与63.7℃3对退火温度之间设置56.5℃、59.5℃和62.5℃3个退火温度进行2次优化,筛选出种特异性引物  $T_m$ 值的阈值,为后续建立多重PCR的反应体系提供高质量的扩增条件。实验结果表明,在56.5℃-62.5℃之间,均只有草地贪夜蛾DNA能成功扩增,其扩增条带均较亮(参见图3,为二次优化)。根据两次优化,得到草地贪夜蛾种特异性引物的PCR  $T_m$ 值阈值为:56.5℃-62.5℃。

[0064] 实验例4种特异性引物与CO I通用引物多重PCR反应体系的建立

[0065] 1、多重PCR反应体系

[0066] 为了确保待测样品中存在可供检测的DNA以保证PCR反应的可靠性,本发明利用LC01490/HC02198引物对与Spf-F/Spf-R建立2对引物的多重PCR反应体系:

[0067] 分别以草地贪夜蛾、斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫和玉米螟的DNA标准溶液作为模板,ddH<sub>2</sub>O作为阴性对照,PCR反应总体积为25 $\mu\text{L}$ ,优化多重PCR反应体系的条件,包括2对引物的浓度配比(其中Spf-F/Spf-R按照实验例3中已优化的用量,对LC01490/HC02198引物对的用量进行优化,以0.4 $\mu\text{L}$ 为基准2倍递增:包括0.4/0.4 $\mu\text{L}$ (A组)、0.8/0.8 $\mu\text{L}$ (B组)、1.2/1.2 $\mu\text{L}$ (C

组))、退火温度 $T_m$ 、循环次数、延伸时间等条件,取5 $\mu$ L PCR产物利用浓度2.5%琼脂糖凝胶电泳检测,预期目标产物为2条(750bp和349bp)或仅1条(750bp),电泳时间13min,电压120V,电流400mA。

[0068] 表4为多重PCR反应体系的成分

成分	用量 ( $\mu$ L)
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L)	0.5
10 $\times$ Taq Buffer	2.5
dNTP Mixture (2.5 mM)	2.0
[0069] Spf-F (正引物) (10 $\mu$ M)	0.4
Spf-R (反引物) (10 $\mu$ M)	0.4
LCO1490 (正引物) (10 $\mu$ M)	需优化
HCO2198 (反引物) (10 $\mu$ M)	需优化
模板 DNA (50 ng/ $\mu$ L)	1.0
ddH <sub>2</sub> O	Up to 25 $\mu$ L

[0070] 多重PCR反应的PCR扩增程序步骤,为:首先94 $^{\circ}$ C预变性5min,然后进行35个循环:94 $^{\circ}$ C 30s, $T_m$ (实验例3中二次优化得到的温度范围) 30s,72 $^{\circ}$ C 20s,最后72 $^{\circ}$ C延伸5min,4 $^{\circ}$ C保存。

[0071] 2、优化结果

[0072] 当退火温度在56.5 $^{\circ}$ C-59.5 $^{\circ}$ C时,在A、B、C组下,草地贪夜蛾DNA的扩增情况存在差异,而另外4个物种DNA均只成功扩增1条约750bp CO I目的条带,且扩增条带较亮。

[0073] 在A组中,草地贪夜蛾DNA成功扩增1条349bp种特异性条带和1条750bp CO I条带,但CO I条带亮度较弱,因此可能会影响结果的判别。优化通用引物LCO1490/HCO2198的用量后(B、C组),CO I条带的产量得到优化,但随着通用CO I引物用量的加大,种特异性条带的产量会相对减少。比较B、C组结果,在退火温度56.5-59.5 $^{\circ}$ C范围内,在B组PCR条件下能在5个物种中对草地贪夜蛾进行稳定的快速鉴定(参见图4-8)。当退火温度高于61.0 $^{\circ}$ C后,在A、B、C组下,草地贪夜蛾的种特异性目的条带或CO I目的条带均较暗,会影响鉴定结果的准确性(参见图7和8)。

[0074] 实验例5种特异性引物多重PCR反应的灵敏度检测

[0075] 1、灵敏度检测

[0076] 将50ng/ $\mu$ L的DNA标准溶液,以2倍递减梯度进行稀释,最终得到5个物种的浓度为50ng/ $\mu$ L、25ng/ $\mu$ L、12.5ng/ $\mu$ L、6.25ng/ $\mu$ L、3.125ng/ $\mu$ L、1.56ng/ $\mu$ L、0.78ng/ $\mu$ L、0.39ng/ $\mu$ L共8个浓度的模板DNA,用于检测多重PCR反应的检测阈值。

[0077] 2、检测结果

[0078] 参见图9,在退火温度56.5 $^{\circ}$ C,引物浓度配比为1:2(即B组)时,DNA标准溶液稀释至0.78ng/ $\mu$ L,粘虫和玉米螟DNA约750bp CO I目的条带的扩增情况不理想,该多重PCR扩增体

系条件不能保证PCR反应的可靠性,当DNA浓度 $>1.56\text{ng}/\mu\text{L}$ 时,各目的条带均较明显,可较准确地鉴定出草地贪夜蛾。

[0079] 参见图10,在退火温度 $59.5^\circ\text{C}$ ,引物浓度配比为1:2时,DNA标准溶液稀释至 $6.25\text{ng}/\mu\text{L}$ ,草地贪夜蛾种特异性条带和玉米螟DNA的目的条带扩增情况均较差,该多重PCR扩增体系条件不能保证PCR反应的可靠性,当DNA浓度 $>12.5\text{ng}/\mu\text{L}$ 时,各目的条带均较明显,可较准确地鉴定出草地贪夜蛾。

[0080] 综上所述,本发明设计出草地贪夜蛾的种特异性引物Spf-F/Spf-R,并建立了Spf-F/Spf-R与CO I通用引物的多重PCR体系。

[0081] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍,但应当认识到上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后,对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此,本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 四川大学
- [0003] <120> 一种草地贪夜蛾种特异性引物对及试剂盒和鉴别方法
- [0004] <160> 5
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 25
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> Artificial Sequence
- [0010] <400> 1
- [0011] ggtcaacaaa tcataaagat attgg 25
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 26
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> Artificial Sequence
- [0016] <400> 2
- [0017] taaacttcag ggtgacaaa aatca 26
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 20
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> Artificial Sequence
- [0022] <400> 3
- [0023] ctcaaatcaa ttattcccca 20
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 24
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> Artificial Sequence
- [0028] <400> 4
- [0029] agaatcagga taatcagaat atcg 24
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 349
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> Artificial Sequence
- [0034] <400> 5
- [0035] ctcaaatcaa ttattcccca tctatTTTTat gaagattagg atttGTattt ttatttactg 60
- [0036] tagggggatt aacaggtgta atTTTatcta attcttctat tgatattact ttacatgata 120
- [0037] cttactatgt agttgctcat ttccactatg tTTTatcaat aggagctgta tttgctattt 180
- [0038] taggtgatt tattcactga tatccattat ttactggatt atctTTaaat ccttatatat 240

---

[0039] taaaaattca attttttatt atatttatcg gagtaaattt aactttcttc ccacaacatt 300  
[0040] ttttaggatt agcaggtata cctcgtcgat attctgatta tcctgattc 349

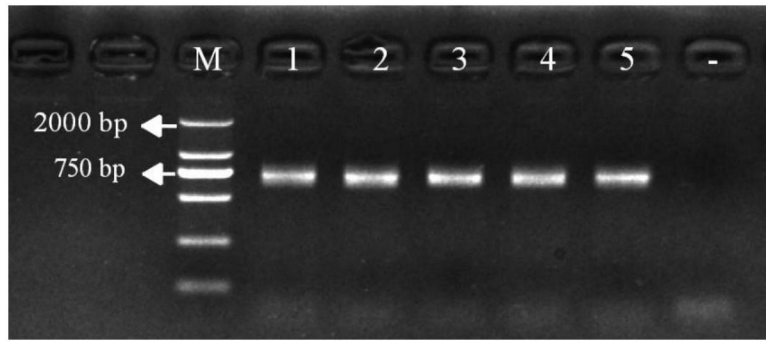


图1

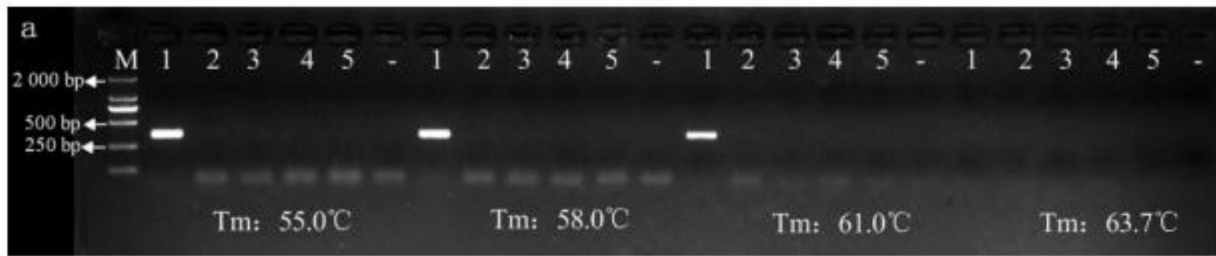


图2

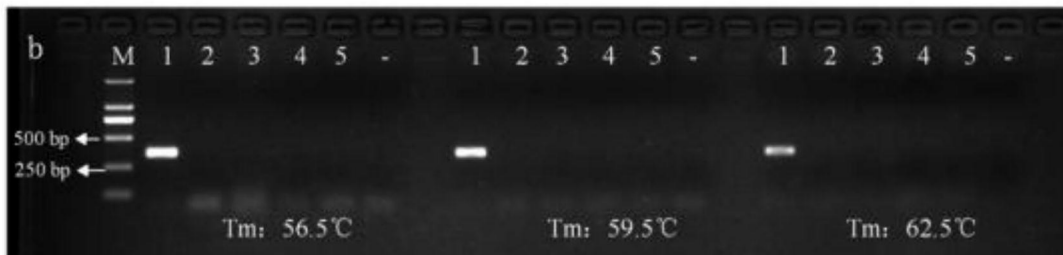


图3

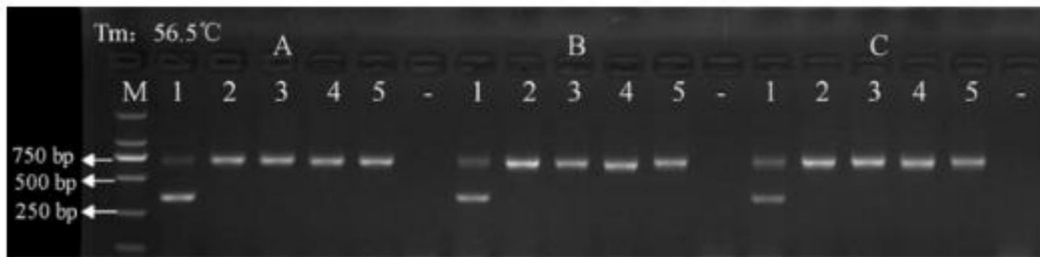


图4



图5

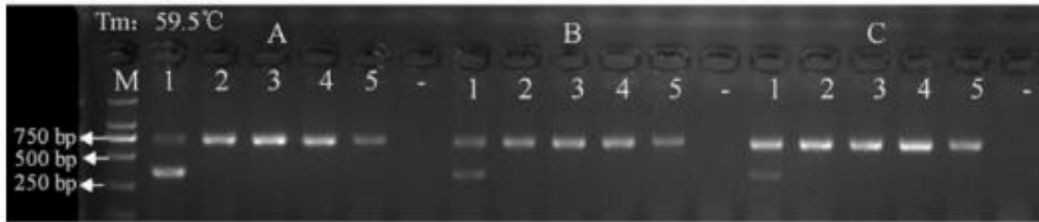


图6



图7

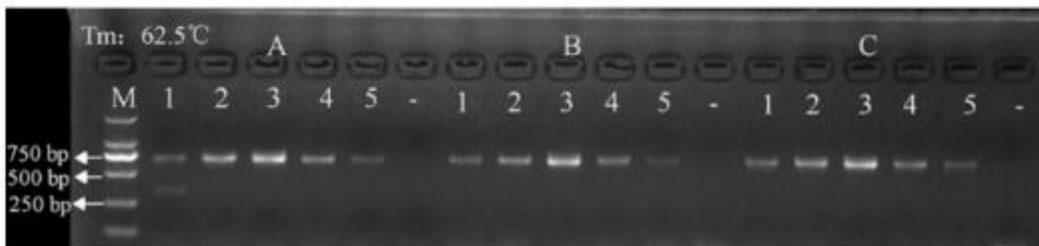


图8



图9

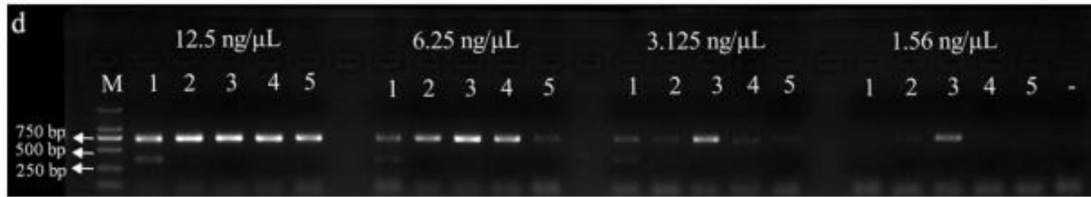


图10