

一种刺参科17种经济海参基于COI基因的PCR-RFLP鉴别方法

申请号：[201410010808.8](#)

申请日：2014-01-09

申请(专利权)人 [中国科学院南海海洋研究所](#)
地址 510301 广东省广州市新港西路164号
发明(设计)人 [夏建军](#) [胡超群](#) [任春华](#) [罗鹏](#) [于宗赫](#)
主分类号 [C12Q1/68\(2006.01\)I](#)
分类号 [C12Q1/68\(2006.01\)I](#)
公开(公告)号 103923972A
公开(公告)日 2014-07-16
专利代理机构 [广州科粤专利商标代理有限公司](#) 44001
代理人 [刘明星](#)



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103923972 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 12

(21) 申请号 201410010808. 8

(22) 申请日 2014. 01. 09

(73) 专利权人 中国科学院南海海洋研究所
地址 510301 广东省广州市新港西路 164 号

(72) 发明人 夏建军 胡超群 任春华 罗鹏
于宗赫

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 刘明星

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103014175 A, 2013. 04. 03, 权利要求
1-4.

律迎春. 海参 DNA 条形码的构建及应用. 《中国水产科学》. 2011, 第 18 卷 (第 4 期), 782-789.

文菁. 16 种商品海参 16S rRNA 的 PCR-RFLP 鉴定方法. 《中国水产科学》. 2011, 第 18 卷 (第 2 期), 451-457.

审查员 孙谦

权利要求书2页 说明书6页

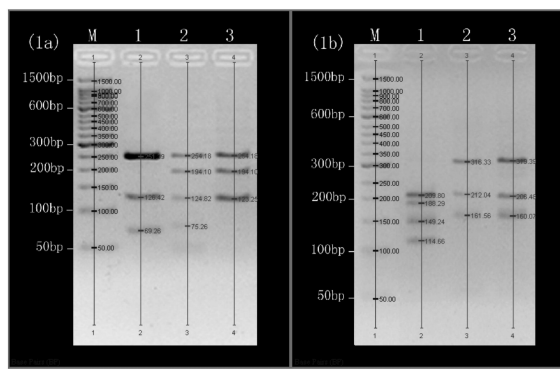
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的
PCR-RFLP 鉴别方法

(57) 摘要

本发明公开了一种刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法。它包括 a、以待检测刺参科海参作为检测样品, 提取其 DNA, 以其作为模板, 利用引物 COIe-F: 5'-ATA ATGATAGGAGGRTTTGG-3', COIe-R: 5'-GCTCGTGTRTC TACRTCCAT-3' PCR 扩增出 COI 片段, 所述的 R 为 A/G ; b、用限制性内切酶组合 DdeI/SfcI 或 BstNI/Sau3AI 对 COI 片段进行酶切, 酶切产物进行电泳, 估算待检测样品各电泳条带大小, 将电泳图中的电泳条带数量及条带大小的估算值与 17 种海参的标准带谱进行对比, 查找到电泳条带数量及大小均与标准谱带匹配的, 该标准谱带所代表的种类即为被检测样品的种类。本发明适用范围广, 操作简单, 检测准确、快速, 尤其适用于大批量商品海参的鉴定, 从而为刺参科海参样品的鉴定提供科学方法, 为规范海参商品市场和保护海参资源提供技术支持。



1. 一种刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

a、以待检测刺参科海参作为检测样品, 提取其 DNA, 然后以其作为模板, 利用引物 COIe-F: 5'-ATAATGATAGGAGGRTTTGG-3', COIe-R: 5'-GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3' PCR 扩增出 COI 片段, 所述的序列中的 R 为 A/G;

b、用限制性内切酶组合 DdeI/SfcI 或 BstNI/Sau3AI 对 COI 片段进行酶切, 酶切产物进行电泳, 估算待检测样品各电泳条带大小, 将电泳图中的电泳条带数量及条带大小的估算值与下表所示 17 种海参的标准带谱进行对比, 查找到电泳条带数量及大小均与标准谱带匹配的, 该标准谱带所代表的种类即为被检测样品的种类:

种类	COI 片段酶切带谱	
	DdeI+SfcI	BstNI+Sau3AI
刺参属 <i>Stichopus</i>		
糙刺参 <i>S.horrens</i>	247, 191, 128/126	325, 205, 162
赫尔曼刺参 <i>S.herrmanni</i>	247, 191, 128/126	205, 190, 162, 135
眼点刺参 <i>S.ocellatus</i>	247, 191, 128/126	205, 190, 162, 100
股肌刺参 <i>S.vastus</i>	247, 191, 128/126	352, 340
花刺参 <i>S.monotuberculatus</i>	247, 191, 126, 75	318, 212, 161 或 318, 212, 150
松刺参 <i>S.naso</i>	373, 272 或 272, 247, 126	352, 205, 100
绿刺参 <i>S.chloronotus</i>	257, 136, 126, 111	205, 190, 150, 92
等刺参属 <i>Isostichopus</i>		
墨西哥刺参 <i>I.fuscus</i>	273, 136, 126, 83	212, 205, 162, 92
美国肉参 <i>I.badionotus</i>	319, 136, 126, 111 或 209, 191, 136, 98	212, 205, 162, 92 或 205, 162, 104/100, 86

无刺参属 <i>Astichopus</i>		
<i>A.multifidus</i>	355, 126, 83, 72	352, 246
梅花参属 <i>Thelenota</i>		
梅花参 <i>T.ananas</i>	191, 136, 126, 90, 72	205, 190, 162, 100
巨梅花参 <i>T.anax</i>	207, 191, 157, 101	305, 150, 77
赤梅花参 <i>T.rubralineata</i>	216, 191, 157, 101	205, 171, 162, 103
仿刺参属 <i>Apostichopus</i>		
仿刺参 <i>A.japonicus</i>	247/245, 128, 72	205, 190, 150, 113
	或 247, 136, 128, 109, 72	或 205, 190, 150, 100
拟刺参属 <i>Parastichopus</i>		
加州拟刺参 <i>P.californicus</i>	191, 136, 128, 109, 72	200, 150, 122, 100
具疣拟刺参 <i>P.parvimensis</i>	191, 136, 128, 109, 72	200, 190, 150, 100
澳洲刺参属 <i>Australostichopus</i>		
新西兰刺参 <i>A.mollis</i>	373, 292	205, 162, 113, 100, 86

2. 根据权利要求1所述的刺参科17种经济海参基于COI基因的PCR-RFLP鉴别方法,其特征在于,所述的步骤a的PCR扩增出COI片段为:PCR反应体积为50 μ L,包含37.6 μ L无菌水,5 μ L 10 \times PCR Buffer,1 μ L 10uM COIe-F引物,1 μ L 10uM COIe-R引物,4 μ L 2.5mM dNTPmixture,0.4 μ L 5U/ μ L TaqTM酶,1 μ L DNA模板;PCR反应条件为,先94 $^{\circ}$ C预变性2分钟,而后94 $^{\circ}$ C变性30秒,48 $^{\circ}$ C复性30秒和72 $^{\circ}$ C延伸45秒,共35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸7分钟,得COI片段。

3. 根据权利要求1所述的刺参科17种经济海参基于COI基因的PCR-RFLP鉴别方法,其特征在于,所述的步骤b的用限制性内切酶组合DdeI/SfcI或BstNI/Sau3AI对COI片段进行酶切具体为:限制性内切酶DdeI/SfcI酶切反应体积为20 μ L,包含2 μ L 10 \times buffer,SfcI和DdeI各3U,16 μ L COI片段,余量为水,反应条件为37 $^{\circ}$ C温浴2个小时;限制性内切酶BstNI/Sau3AI酶切反应体积为20 μ L,包含2 μ L 10 \times buffer,BstNI和Sau3AI各4U,16 μ L COI片段,余量为水,反应条件为先37 $^{\circ}$ C温浴1个小时,随后60 $^{\circ}$ C温浴1个小时。

一种刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种简便的海参种类分子鉴定方法，具体涉及一种刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法。

背景技术：

[0002] 海参具有较高的营养价值和药用价值，在我国被认为是传统的美味和滋补品，位列“八珍”之一。全球记录的海参种类有 1400 多种，而可供食用的海参种类约 50 多种，主要是海参科(Holothuriidae)和刺参科(Stichopodidae)种类。与海参科种类相比，刺参科海参背面有较大疣足，骨片多为桌形体，无扣状体，但有 C 形体或双分枝杆状体，或简单颗粒体。作为名贵的海产品，海参在市场上通常加工为干品或冻品出售，海参经过多道工序加工成干品后，很难从外部形体上分辨出其种类。目前在市面上销售的海参产品，大多根据其颜色和产地来命名贴标，如“美国红参”、“非洲海参”等，缺乏规范的商品命名，海参市场贴标混乱。因此，非常有必要开发出准确区分和鉴定海参种类的方法。

[0003] 线粒体 DNACO1 序列被广泛应用在海参系统进化和种类鉴定的研究中，CO1PCR-RFLP 是一种操作简单、快捷的种类鉴别方法，目前该方法在海参种类鉴定中应用较少，缺乏系统研究。

发明内容：

[0004] 本发明的目的是提供一种适用范围广，操作简单，对仪器设备要求低，检测准确、快速，尤其适用于大批量商品海参鉴定的刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法。

[0005] 本发明的刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法，其特征在于，包括以下步骤：

[0006] a、以待检测刺参科海参作为检测样品，提取其 DNA，然后以其作为模板，利用引物 COIe-F:5`-ATAATGATAGGAGGRTTTGG-3`，COIe-R:5`-GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3` PCR 扩增出 COI 片段，所述的 R 为 A/G；

[0007] b、用限制性内切酶组合 DdeI/SfcI 或 BstNI/Sau3AI 对 COI 片段进行酶切，酶切产物进行电泳，估算待检测样品各电泳条带大小，将电泳图中的电泳条带数量及条带大小的估算值与下表所示 17 种海参的标准带谱进行对比，查找到电泳条带数量及大小均与标准谱带匹配的，

[0008] 该标准谱带所代表的种类即为被检测样品的种类：

[0009]

种类	COI 片段酶切带谱	
	DdeI+SfcI	BstNI+Sau3AI
刺参属 <i>Stichopus</i>		
糙刺参 <i>S.horrens</i>	247, 191, 128/126	325, 205, 162
赫尔曼刺参 <i>S.herrmanni</i>	247, 191, 128/126	205, 190, 162, 135
眼点刺参 <i>S.ocellatus</i>	247, 191, 128/126	205, 190, 162, 100
股肌刺参 <i>S.vastus</i>	247, 191, 128/126	352, 340
花刺参 <i>S.monotuberculatus</i>	247, 191, 126, 75	318, 212, 161 或 318, 212, 150
松刺参 <i>S.naso</i>	373, 272 或 272, 247, 126	352, 205, 100
绿刺参 <i>S.chloronotus</i>	257, 136, 126, 111	205, 190, 150, 92
等刺参属 <i>Isostichopus</i>		
墨西哥刺参 <i>I.fuscus</i>	273, 136, 126, 83	212, 205, 162, 92
美国肉参 <i>I.badionotus</i>	319, 136, 126, 111 或 209, 191, 136, 98	212, 205, 162, 92 或 205, 162, 104/100, 86

[0010]

无刺参属 <i>Astichopus</i>		
<i>A.multifidus</i>	355, 126, 83, 72	352, 246
梅花参属 <i>Thelenota</i>		
梅花参 <i>T.ananas</i>	191, 136, 126, 90, 72	205, 190, 162, 100
巨梅花参 <i>T.anax</i>	207, 191, 157, 101	305, 150, 77
赤梅花参 <i>T.rubralineata</i>	216, 191, 157, 101	205, 171, 162, 103
仿刺参属 <i>Apostichopus</i>		
仿刺参 <i>A.japonicus</i>	247/245, 128, 72	205, 190, 150, 113
	或 247, 136, 128, 109, 72	或 205, 190, 150, 100
拟刺参属 <i>Parastichopus</i>		
加州拟刺参 <i>P.californicus</i>	191, 136, 128, 109, 72	200, 150, 122, 100
具疣拟刺参 <i>P.parvimensis</i>	191, 136, 128, 109, 72	200, 190, 150, 100
澳洲刺参属 <i>Australostichopus</i>		
新西兰刺参 <i>A.mollis</i>	373, 292	205, 162, 113, 100, 86

[0011] 所述的步骤 a 的 PCR 扩增出 COI 片段优选为:PCR 反应体积为 50 μ L, 包含 37.6 μ L 无菌水, 5 μ L 10 \times PCRBuffer, 1 μ L 10uMCOIe-F 引物, 1 μ L 10uMCOIe-R 引物, 4 μ L 2.5mM dNTPmixture, 0.4 μ L 5U/ μ L TaqTM 酶, 1 μ L DNA 模板;PCR 反应条件为, 先 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟, 而后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 48 $^{\circ}$ C 复性 30 秒和 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 秒, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟, 得 COI 片段。

[0012] 所述的步骤 b 的用限制性内切酶组合 DdeI/SfcI 或 BstNI/Sau3AI 对 COI 片段进行酶切具体优选为:限制性内切酶 DdeI/SfcI 酶切反应体积为 20 μ L, 包含 2 μ L 10 \times buffer, SfcI 和 DdeI 各 3U, 16 μ L COI 片段, 余量为水, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C 温浴 2 个小时;限制性内切酶 BstNI/Sau3AI 酶切反应体积为 20 μ L, 包含 2 μ L 10 \times buffer, BstNI 和 Sau3AI 各 4U, 16 μ L COI 片段, 余量为水, 反应条件为先 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 个小时, 随后 60 $^{\circ}$ C 温浴 1 个小时。

[0013] 本发明首次建立了刺参科 17 种经济海参的 COI-PCR-RFLP 鉴定方法, 它适用范围广, 操作简单, 对仪器设备要求低, 检测准确、快速, 尤其适用于大批量商品海参的鉴定, 从而为刺参科海参样品的鉴定提供科学方法, 为规范海参商品市场和保护海参资源提供技术支持。

附图说明:

[0014] 图 1 是本发明的实施例 1、2 和 3 中海参 COI 片段的 PCR-RFLP 琼脂糖凝胶电泳图及各电泳片段估算值。图 1a 中泳道 1、2、3 分别为仿刺参、花刺参和糙刺参 COI 片段 DdeI/SfcI 的酶切电泳图, 图 1b 中泳道 1、2、3 分别为仿刺参、花刺参和糙刺参 COI 片段 BstNI/Sau3AI 的酶切电泳图;M:50bp DNA Ladder (1500bp、1000bp、900bp、800bp、700bp、600bp、

500bp、450bp、400bp、350bp、300bp、250bp、200bp、150bp、100bp、50bp)。

具体实施方式：

[0015] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明，不是对本发明的限制。

[0016] 实施例 1：仿刺参样品 PCR-RFLP 鉴定

[0017] a. 仿刺参样品 COI 片段的 PCR 扩增：

[0018] 常规方法提取仿刺参样品的 DNA，然后以其作为模板 PCR 扩增 COI 片段，PCR 扩增反应体积为 50 μ L，取 200 μ L PCR 管置冰浴中，依次添加 37.6 μ L 无菌水，5 μ L 10 \times PCRBuffer (包括 15mM Mg^{2+})，1 μ L 10uMCOIe-F 引物，1 μ L 10uMCOIe-R 引物，4 μ L 2.5mM dNTP mixture，0.4 μ L 5U/ μ L TaKaRaTaqTM 酶，1 μ L 仿刺参样品 DNA 模板；采用 ABI Veriti96 孔热循环仪扩增，反应条件为先 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟，而后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、48 $^{\circ}$ C 复性 30 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 秒，共 35 个循环，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟。COIe-F 引物序列为 5'-ATAATGATAGGAGGRTTTGG-3'，COIe-R 引物序列为 5'-GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3'，所述的 R 为 A/G。由此得到 PCR 产物，即为仿刺参的 COI 片段。

[0019] b. 仿刺参样品 PCR 产物(仿刺参的 COI 片段)的酶切：

[0020] 限制性内切酶 DdeI/SfcI (NEB 公司)酶切反应，反应体积为 20 μ L，取 500 μ L 离心管置冰浴中，依次添加 1.4 μ L 无菌水，2 μ L 10 \times buffer，0.3 μ L 10U/ μ L SfcI，0.3 μ L 10U/ μ L DdeI，16 μ L COI 片段；反应条件为放置在金属浴上 37 $^{\circ}$ C 温浴 2 个小时。限制性内切酶 BstNI/Sau3AI (NEB 公司)酶切反应，体积为 20 μ L，取 500 μ L 离心管置冰浴中，依次添加 0.6 μ L 无菌水，2 μ L 10 \times buffer，0.4 μ L 10U/ μ L BstNI，1.0 μ L 4U/ μ L Sau3AI，16 μ L COI 片段；反应条件为放置在金属浴上先 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 个小时，随后 60 $^{\circ}$ C 温浴 1 个小时。由此得到酶切反应液。

[0021] c. 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测：

[0022] 琼脂糖凝胶电泳检测中，先制备 2.5% 琼脂糖凝胶；待胶凝固后，将胶置电泳槽 (DYCP-31DN 型，六一公司)中，注入 0.5 \times TBE 缓冲液淹没胶孔，胶孔中加入 10 μ L 酶切反应液与 1.5 μ L 上样缓冲液混合液，在相邻胶孔加入 7.5 μ L 50bpDNALadder (TaKaRa 公司)；电泳时，电压为 90V，电泳时间为 1.5 小时。

[0023] d. 检测结果的判定

[0024] 电泳结束后，凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司)下拍照，获得仿刺参样品 COI 片段两组内切酶 DdeI/SfcI 和 BstNI/Sau3AI 的酶切电泳图 (见图 1)。添加的 50bpDNALadder 设定为分子量标准。采用 Quantityone 软件估算被检测样品各电泳条带的片段大小。将电泳条带数量及估算值与表 1 中各标准带谱进行对比，各电泳条带估算值与标准带谱中对应片段预测值相差不超过 10bp，查找到条带数量及大小均与标准谱带匹配的，该标准谱带所代表的种类即为被检测样品的种类。Quantityone 软件估算得到：① DdeI/SfcI 双酶切下的 3 条带估算值，分别为 251.39bp、126.42bp 和 69.26bp；② BstNI/Sau3AI 双酶切下的 4 条带估算值，分别为 209.80bp、188.29bp、149.24bp 和 114.67bp。与表 1 比对，与仿刺参条带数目相同，且每个电泳条带的估算值与标准带谱中对应的片段大小相匹配，因此可以判定待鉴定样品为仿刺参。

[0025] 表 1：刺参科 17 种海参 COI 扩增片段的酶切带谱数据 (70bp 以下片段不计)

[0026]

种类	COI 片段酶切带谱	
	DdeI+SfcI	BstNI+Sau3AI
刺参属 <i>Stichopus</i>		
糙刺参 <i>S.horrens</i>	247, 191, 128/126	325, 205, 162
赫尔曼刺参 <i>S.herrmanni</i>	247, 191, 128/126	205, 190, 162, 135
眼点刺参 <i>S.ocellatus</i>	247, 191, 128/126	205, 190, 162, 100
股肌刺参 <i>S.vastus</i>	247, 191, 128/126	352, 340
花刺参 <i>S.monotuberculatus</i>	247, 191, 126, 75	318, 212, 161 或 318, 212, 150
松刺参 <i>S.naso</i>	373, 272 或 272, 247, 126	352, 205, 100
绿刺参 <i>S.chloronotus</i>	257, 136, 126, 111	205, 190, 150, 92
等刺参属 <i>Isostichopus</i>		
墨西哥刺参 <i>I.fuscus</i>	273, 136, 126, 83	212, 205, 162, 92
美国肉参 <i>I.badionotus</i>	319, 136, 126, 111 或 209, 191, 136, 98	212, 205, 162, 92 或 205, 162, 104/100, 86
无刺参属 <i>Astichopus</i>		
<i>A.multifidus</i>	355, 126, 83, 72	352, 246
梅花参属 <i>Thelenota</i>		
梅花参 <i>T.ananas</i>	191, 136, 126, 90, 72	205, 190, 162, 100
巨梅花参 <i>T.anax</i>	207, 191, 157, 101	305, 150, 77
赤梅花参 <i>T.rubralineata</i>	216, 191, 157, 101	205, 171, 162, 103

[0027]

仿刺参属 *Apostichopus*

仿刺参 <i>A.japonicus</i>	247/245, 128, 72	205, 190, 150, 113
	或 247, 136, 128, 109, 72	或 205, 190, 150, 100

拟刺参属 *Parastichopus*

加州拟刺参 <i>P.californicus</i>	191, 136, 128, 109, 72	200, 150, 122, 100
具疣拟刺参 <i>P.parvimensis</i>	191, 136, 128, 109, 72	200, 190, 150, 100

澳洲刺参属 *Australostichopus*

新西兰刺参 <i>A.mollis</i>	373, 292	205, 162, 113, 100, 86
-----------------------	----------	------------------------

[0028] 实施例 2 :花刺参样品 PCR-RFLP 鉴定

[0029] 步骤 a-c 同实施例 1, 只是以花刺参作为样品。

[0030] d. 检测结果的判定

[0031] 电泳结束后, 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)下拍照, 获得花刺参样品 COI 片段两组内切酶 DdeI/SfcI 和 BstNI/Sau3AI 的酶切电泳图(见图 1); 添加的 50bpDNALadder 设定为分子量标准, Quantityone 软件估算得到: ① DdeI/SfcI 双酶切下的 4 条带估算值, 为 254.18bp、194.10bp、124.82bp 和 75.26bp; ② BstNI/Sau3AI 双酶切下的 3 条带估算值, 为 316.33bp、212.04bp 和 161.56bp。与表 1 比对, 与花刺参条带数目相同, 且每个电泳条带的估算值与标准带谱中对应的片段大小相匹配, 因此可以判定待鉴定样品为花刺参。

[0032] 实施例 3 :糙刺参样品 PCR-RFLP 鉴定

[0033] 步骤 a-c 同实施例 1, 只是以糙刺参作为样品。

[0034] d. 检测结果的判定

[0035] 电泳结束后, 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)下拍照, 获得糙刺参样品 COI 片段两组内切酶 DdeI/SfcI 和 BstNI/Sau3AI 的酶切电泳图(见图 1); 添加的 50bpDNALadder 设定为分子量标准, Quantityone 软件估算得到: ① DdeI/SfcI 双酶切下的 3 条带估算值, 为 254.18bp、194.10bp 和 123.25bp; ② BstNI/Sau3AI 双酶切下的 3 条带估算值, 为 319.39bp、206.48bp 和 160.07bp。与表 1 比对, 与糙刺参条带数目相同, 且每个电泳条带的估算值与标准带谱中对应的片段大小相匹配, 因此可以判定待鉴定样品为糙刺参。

[0001]

序列表

<110>中国科学院南海海洋研究所

<120>一种刺参科 17 种经济海参基于 COI 基因的 PCR-RFLP 鉴别方法

<160>1

<210>1

<211>20

<212>DNA

<213>人工合成

<400>1

ATAATGATAG GAGGRTTTGG 20

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>人工合成

<400>2

GCTCGTGTRT CTACRTCCAT 20

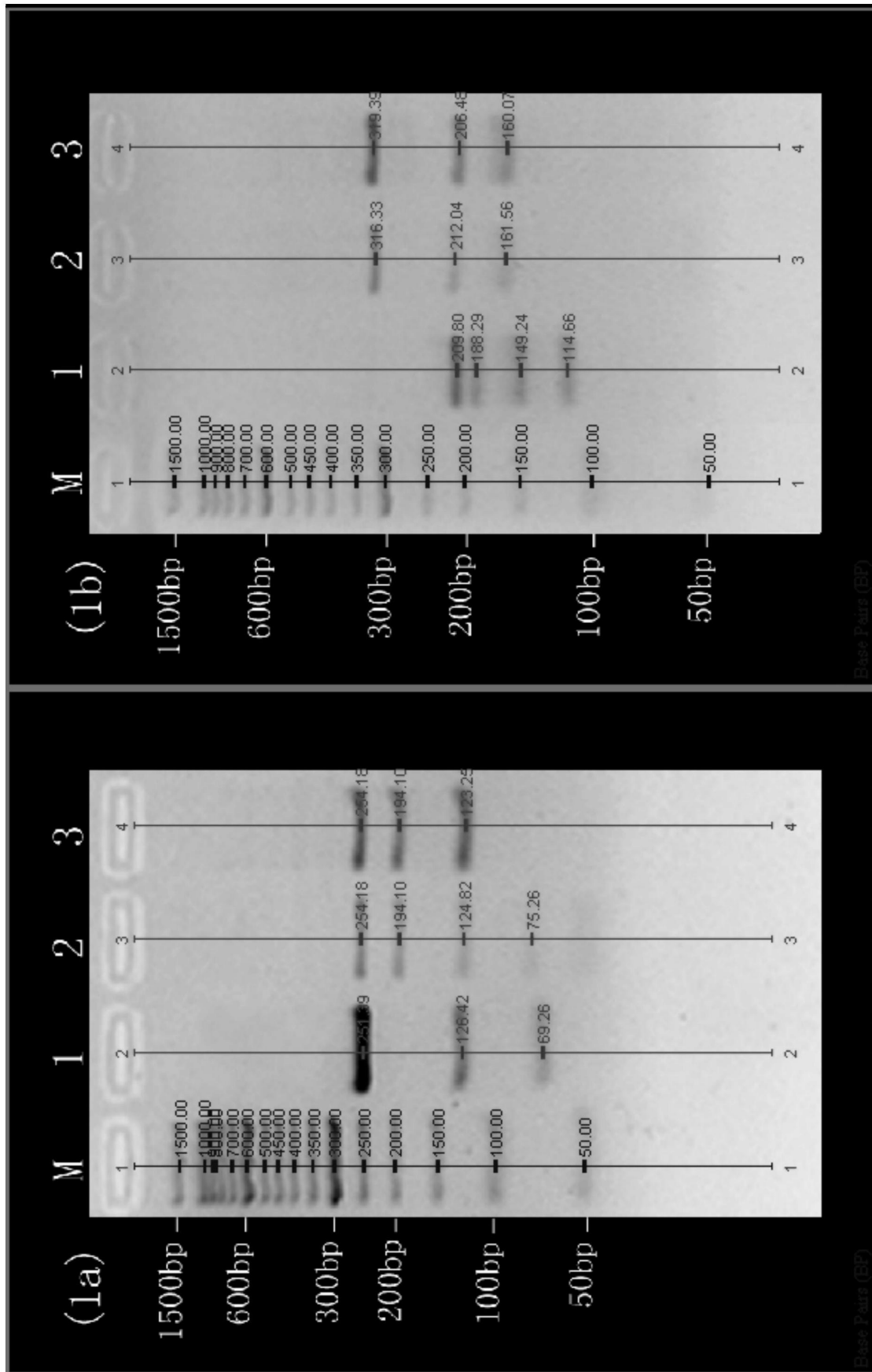


图 1