



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104357568 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410627685. 2

C12N 15/11 (2006. 01)

(22) 申请日 2014. 11. 10

(71) 申请人 杭州市公安局上城区分局

地址 310002 浙江省杭州市上城区中河中路
88 号

(72) 发明人 倪萍娅 裴黎 黄恺 张颖 宦军
程亚群 章申峰 张利权 吴铖铖
叶胡明 徐小玉 马原 戈文东
冯涛 张贵芹 彭建雄 涂政
刘开会 季安全 李佑英

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

大麻遗传标记多态性检测体系

(57) 摘要

本发明公开了大麻遗传标记多态性检测体系。本发明提供了一种用于鉴定大麻的引物组,由引物对 1-5 共 5 个引物对组成。本发明的实验证明,本发明有如下优点:1、同时扩增大麻 5 个 STR 基因座,比单个基因座的扩增更加高效、快捷,为 大麻 STR 基因座的进一步研究、大麻 STR 数据库的建立、案件中大麻的检验鉴定提供了有效的方法;2、优化后的大麻 STR 5plex 各基因座间能实现平衡扩增、具有高灵敏度和稳定性,利于检验涉毒案件中经常遇到的腐败检材;3、准确率高,采自不同产地的大麻样本,经检测和数据统计分析,能够得到各自在 5 个基因座上的分型。

1. 一种用于鉴定大麻的引物组,由引物对 P17、P19、P25、P14 和 P24 共 5 个引物对组成:

所述引物对 P17 由序列表中序列 1 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 2 所示的单链 DNA 分子组成;

所述引物对 P19 由序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 4 所示的单链 DNA 分子组成;

所述引物对 P25 由序列表中序列 5 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 6 所示的单链 DNA 分子组成;

所述引物对 P14 由序列表中序列 7 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 8 所示的单链 DNA 分子组成;

所述引物对 P24 由序列表中序列 9 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 10 所示的单链 DNA 分子组成。

2. 根据权利要求 1 所述的引物组,其特征在于:

所述引物对 P17、P19 和 P25 中每对引物对中的一条引物均标记 FAM;

所述引物对 P14 和 P24 中每对引物对中的一条引物均标记 HEX。

3. 一种用于鉴定大麻的 PCR 试剂,包括含有权利要求 1 或 2 中的所述引物组的 PCR 试剂。

4. 根据权利要求 3 所述的 PCR 试剂,其特征在于:

所述引物对 P14、P17 中的各条引物在所述 PCR 试剂中的终浓度均为 $0.3\mu\text{M}$;

所述引物对 P16、P24 中的各条引物在所述 PCR 试剂中的终浓度均为 $0.15\mu\text{M}$;

所述引物对 P25 中的各条引物在所述 PCR 试剂中的终浓度均为 $0.35\mu\text{M}$ 。

5. 含有权利要求 1 或 2 所述引物或含有权利要求 3 或 4 所述 PCR 试剂的试剂盒。

6. 权利要求 1 或 2 所述引物、权利要求 3 或 4 所述 PCR 试剂或权利要求 5 所述的试剂盒在鉴定大麻中的应用;

或权利要求 1 或 2 所述引物、权利要求 3 或 4 所述 PCR 试剂在制备鉴定大麻产品中的应用。

7. 权利要求 1 或 2 所述引物、权利要求 3 或 4 所述 PCR 试剂或权利要求 5 所述的试剂盒在鉴定待测样本是否含有大麻中的应用;

或权利要求 1 或 2 所述引物、权利要求 3 或 4 所述 PCR 试剂在制备鉴定待测样本是否含有大麻产品中的应用。

8. 一种辅助待测样本是否为大麻或是否含有大麻的方法,包括如下步骤:

用权利要求 1 或 2 中的所述 5 个引物对共同对待测样本基因组 DNA 进行 STR 复合扩增,得到扩增产物;检测所述扩增产物,

若扩增产物满足如下 1)-5) 全部标准,则待测样本候选为大麻或者候选含有大麻;若扩增产物不满足如下 1)-5) 全部标准,则待测样本候选不为大麻或者候选不含有大麻;

所述标准为:

1) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 97-112bp 的等位基因片段;

2) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 231-249bp 的等位基因片段;

3) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 266-273bp 的等位基因片段;

- 4) 含有显 HEX 基团颜色且大小为 163-177bp 的等位基因片段；
 - 5) 含有显 HEX 基团颜色且大小为 102-117bp 的等位基因片段。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于:
- 所述 STR 复合扩增反应退火温度为 55.5℃;
- 所述待测样本为样本的基因组 DNA。

大麻遗传标记多态性检测体系

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及大麻遗传标记多态性检测体系。

背景技术

[0002] 大麻为被子植物门荨麻目大麻科大麻属一年生雌雄异株草本植物。大麻属植物主要有栽培大麻 (*Cannabis sativa* L)、印度大麻 (*Cannabis sativa* L) 和野生大麻 (*Cannabis ruderalis* Janisch) 3 个品种,在长期的生物自然进化和人工培育过程中又产生了许多大麻变种和亚种。大麻具有悠久的栽培历史,是许多国家重要的经济作物,被用作纺织纤维、动物饲料、油料、药物和麻醉品。大麻具有至幻作用,能作用于神经系统,具有强烈的成瘾性和麻醉性,使人的神经由兴奋转为抑制,所以联合国公约将其列为与海洛因、可卡因并列的三大毒品之一。大麻至幻作用的有效成分包括大麻二酚 (CBD)、大麻酚 (CND) 和四氢大麻酚 (THC),其中起重要作用的是 THC。通常根据 THC 和 CBD 的含量将大麻分为毒品型大麻 ($\text{THC} > 0.5\%$, $\text{CBD} < 0.5\%$, 即 $\text{THC}/\text{CBD} > 1$)、中间型大麻 ($\text{THC} > 0.5\%$, $\text{CBD} > 0.5\%$) 和纤维型大麻 ($\text{THC} < 0.5\%$, $\text{CBD} > 0.5\%$, 即 $\text{THC}/\text{CBD} < 1$)。虽然包括我国在内的许多国家均明文规定对大麻的种植等活动进行限制、管制、监察和检察等措施。然而在高额利润的驱使下,全球范围的毒品大麻种植和非法交易活动屡禁不止。与此同时,在大麻犯罪案件中缴获成批未加工的大麻植物(如整株植物、种子等)的情况也屡见不鲜。在法庭科学中,虽然可用传统的植物形态学方法和理化方法如常规化学法、毛细管电泳法、薄层色谱法等对大麻进行鉴定,但这些方法有很大的局限性,对检材的要求较高且不能进行有效的产地推断,所以为了更好的进行大麻种属鉴定,同时以期实现法庭科学推断大麻来源的需要,尝试寻求新的更好的方法来解决这一问题。

[0003] 近年来随着分子生物学的快速发展,用 DNA 检验技术对大麻进行分子水平的鉴定成为法庭科学研究的热点和新技术方法。

[0004] RAPD 即随机扩增多态性 DNA 标记,是建立在 PCR 基础之上的一种可对整个未知序列基因组进行多态性分析的分子技术。它采用人工合成的含有 9-10 个碱基的随机序列组成的寡核酸做引物,通过 PCR 扩增获得长度不同的多态性 DNA 片断。RAPD 形成的遗传基础是:在 DNA 等位区域内,因引物靶序列发生点突变,使扩增子(两个反向聚合的引物靶序列之间的 DNA 区域)丢失,产生显性的 RAPD,或因扩增子内发生序列的插入、缺失突变,产生共显性的 RAPD。个体的模板不同,其扩增产物就不同。在关于大麻的研究中,1995 年 Gillan 和 Cole 等运用 RAPD 和 HPLC 两种方法对 17 株大麻标本进行检测,利用 RAPD 技术成功地对 HPLC 无法区分的大麻样本进行了鉴定。1996 年, Jagadish 等用 RAPD 技术成功区分了大麻和蛇麻草。Sakamoto 等(1995 年)、Mandolino 等(1999 年)及陈其军等(2001 年)分别将用 RAPD 技术获得的 RAPD 分子标记转化为 SCAR 标记。研究证明 RAPD 可以对大麻进行有效的种属鉴定。但是由于 RAPD 方法对模板 DNA 要求较高,且随机引物的片段较短,扩增产物的稳定性和重复性欠佳,检测费用较高,费时费事,所以在法庭科学实际工作中很难作为常规检测方法,其一般被用于大麻遗传多样性的研究及特异性片段的筛查等工作中。

[0005] AFLP 检测技术是 RAPD 和 RFLP 技术相结合的产物,该技术的原理是对基因组 DNA 限制性酶切片段进行选择扩增,它具有多态性强、不需预先知道目标基因组序列、DNA 模板浓度宽容度大、谱带清晰,实验稳定性好等优点。在关于大麻的研究中,2006 年,Shannon L 等利用 AFLP 分子标记对三个工业纤维大麻品种和一个高毒药用品种间的遗传差异进行检测,10 对引物扩增检测出 1206 条普带,其中 88% 具有多态性,其中 18 条普带对工业大麻和高毒大麻具有鉴别意义。郭佳等用银染 AFLP 技术用 55 对引物组合对 12 个大麻地域品种进行初筛,选出了 5 对多态性好的引物组合,每对 AFLP 引物组合扩增出 47 ~ 76 条普带。AFLP 技术存在操作繁琐,费时费力,不便进行数据统计和对比等不足,所以 AFLP 也一般被用于标记的筛查等。

[0006] 单核苷酸序列多态性 (SNP) 是基因组水平上单个核苷酸的变异引起的 DNA 序列多态性,是新近发展起来的一种分子遗传标记技术。其具有分布广泛、数量众多、易于批量检测等优点。2010 年,Rotherham D 等尝试运用 SNP 芯片鉴别药用型大麻和非药用型大麻,取得了一定的进展。SNP 技术为二等位基因标记,具有巨大的优势和潜力。随着 DNA 芯片等技术的发展,其被应用于大麻种属、品种检验具有良好的发展前途。但由于其检测仪器费用高昂等原因,大麻 SNP 的发展还需要进行大量的基础研究。

[0007] 短串联重复序列 STR 是由 2-6bp 的核心序列串联重复多次组成的寡核苷酸序列,因重复次数不同而具有高度多态性。STR 标记被广泛应用到法庭科学实践中进行个体识别和亲子鉴定。也有部分法庭科学家尝试利用 STR 标记对植物 DNA 进行分析的报道。STR 技术的优势在于基因座位点丰富、多态性较高、结果稳定,检测可实现自动化,节省时间和人力,所以目前用 STR 标记来鉴别大麻、区分大麻品种等法庭科学研究取得了一定的成果。目前用于法庭科学的研究检验的 STR 标记主要有 27 个。2003 年,Hsieh 等人报道了第一个大麻 STR 基因座。数据显示该基因座的重复单位为 6bp,具有高度的多态性,检测的 108 个样本中该基因座的重复次数从 3 ~ 40 次不等,杂合度接近 87.04%。结果显示此基因座可将大麻与其近缘物种(例如烟草)进行区分,因此可用于对大麻的鉴定和研究大麻种间的遗传关系。同年 Gimore 等使用 5 个 STR 基因座标记检测了 93 株大麻,共得到 79 种等位基因,结果经统计学分析,得出大麻不同品种间具有遗传多样性的结论,证明 STR 技术用于鉴别大麻植物的来源地具有一定可行性。而 Alghanim 和 Almirall 报道了一项关于大麻 STR 基因座结构类型的研究成果,他们利用 12 个不同的寡核苷酸探针对大麻 STR 基因座进行筛查,数据结果显示,49% 的克隆产物含有微卫星序列,其中 GA/CT 约占 50%,GTT/CAA 占 16%,AAG/TTC 占 15%,GAT/CTA 占 10%。同时他们还开发了 11 个多态性 STR 标记(3 个二核苷酸序列和 8 个三核苷酸序列),并从中检测到了 52 个等位基因,这 11 个 STR 基因座杂合度的范围是 0.386 ~ 0.710,在群体中检出相同基因型的机会为 1.8×10^{-7} 。研究结果表明这 11 个 STR 标记可以用于大麻的 DNA 分型及大麻品种间亲缘关系的评估。2008 年 Howard 等在 SWGDAM 的指导下建立了大麻 STR 复合扩增系统,他们选取了 10 个三核苷酸重复单位的 STR 基因座(ANUCS301,ANUCS302,ANUCS303,ANUCS304,ANUCS305,ANUCS501,B01-CANN1,B05-CANN1,B02-CANN2,C11-CANN1),采用 4 个复合扩增体系对分别从大麻干燥根、茎、叶以及新鲜叶片、冰冻叶片、干燥叶片组织提取的 DNA 进行检测研究,结果表明干燥叶片组织是进行大麻 STR 分析的最好 DNA 来源,进行扩增的最佳 DNA 模板量为 10ng;通过对大麻的近缘植物如烟草等的分析说明该复合系统具有较好的特异性。2009 年 Howard 等建立了第一

个澳大利亚大麻 STR 基因数据库,也是世界上第一个大麻 STR 基因数据库。这一数据库是在 2008 年研究成果的基础上,利用以上 10 个 STR 基因座对 510 个大麻植物样本(其中包含 57 份纤维大麻样本)进行扩增分析并建立起来的。实验中共检测到了 106 个等位基因和 314 种不同的基因型,所有的纤维大麻样本呈现单一的基因型,55% 的毒品大麻样本存在一份或几份样本基因型相同的情况。数据分析结果表明这种相同基因型的情况是由无性繁殖产生的。这提示了被检测的大麻可能来源于同一个母体,从而为案件的侦破提供了有价值的线索。同年 Maria 等报道了一个包含 6 个 STR 基因座的复合扩增体系。通过这个复合扩增体系成功鉴别出了来自于美国 33 个州的 98 份大麻样本(包括 14 份纤维大麻和 84 份毒品大麻)。2011 年 Stephan 等选取了 15 个 STR 基因座进行复合扩增,对 63 份大麻样本进行了检测,该复合体系建议的 PCR 初始模板量为 32ng,其检测结果表明用 STR 进行地域来源的确认具有一定的可行性。此外,就国内而言,大麻 STR 基因座的研究才刚刚起步,2008 年马原等用 3 个 STR 基因座对 62 份来自四个不同品种的云南大麻进行了个体和群体的遗传多态性调查。这一研究为应用 STR 遗传信息推断中国毒品原植物的品种和产地提供理论基础。总的说来,目前关于大麻的研究主要倾向于毒品型大麻与非毒品型大麻的研究,涉及到大麻地域来源的研究十分稀少。国外关于大麻的复合扩增体系的研究仍处于初级阶段,在国内则是空白。

发明内容

[0008] 有鉴于此,为了填补国内大麻 STR 复合扩增体系研究的空白,为实现用大麻 STR 基因座进行大麻地域来源推断、为以后建立中国大麻 STR 基因库等的研究提供有力的技术支持与保障,发明了这一简便、快速、高效的大麻 STR5plex 荧光复合扩增检测体系。

[0009] 本发明的一个目的提供一种用于鉴定大麻的引物组。

[0010] 本发明提供的引物组,由引物对 P17、P19、P25、P14 和 P24 共 5 个引物对组成:

[0011] 所述引物对 P17 由序列表中序列 1 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 2 所示的单链 DNA 分子组成;

[0012] 所述引物对 P19 由序列表中序列 3 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 4 所示的单链 DNA 分子组成;

[0013] 所述引物对 P25 由序列表中序列 5 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 6 所示的单链 DNA 分子组成;

[0014] 所述引物对 P14 由序列表中序列 7 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 8 所示的单链 DNA 分子组成;

[0015] 所述引物对 P24 由序列表中序列 9 所示的单链 DNA 分子和序列表中序列 10 所示的单链 DNA 分子组成。

[0016] 上述引物组中,所述引物对中的一条引物均用荧光标记,其中,所述引物对 P17、P19 和 P25 中每对引物对中的一条引物均标记 FAM;

[0017] 所述引物对 P14 和 P24 中每对引物对中的一条引物均标记 HEX。

[0018] 本发明另一个目的是提供一种用于鉴定大麻的 PCR 试剂。

[0019] 本发明提供的 PCR 试剂,包括含有上述引物组的 PCR 试剂。

[0020] 上述的 PCR 试剂中,所述引物对 P14、P17 中的各条引物在所述 PCR 试剂中的终浓

度均为 $0.3 \mu\text{M}$;

[0021] 所述引物对 P16、P24 中的各条引物在所述 PCR 试剂中的终浓度均为 $0.15 \mu\text{M}$;

[0022] 所述引物对 P25 中的各条引物在所述 PCR 试剂中的终浓度均为 $0.35 \mu\text{M}$ 。

[0023] 含有上述引物或含有上述 PCR 试剂的试剂盒也是本发明保护的范围。

[0024] 上述引物、上述 PCR 试剂或上述的试剂盒在鉴定大麻中的应用也是本发明保护的范围;

[0025] 或上述引物、上述 PCR 试剂在制备鉴定大麻产品中的应用也是本发明保护的范围。

[0026] 上述引物、上述 PCR 试剂或上述的试剂盒在鉴定待测样本是否含有大麻中的应用也是本发明保护的范围;

[0027] 或上述引物、上述 PCR 试剂在制备鉴定待测样本是否含有大麻产品中的应用也是本发明保护的范围。

[0028] 本发明第三个目的是提供一种辅助待测样本是否为大麻或是否含有大麻的方法。

[0029] 本发明提供的方法,包括如下步骤:

[0030] 用上述 5 个引物对共同对待测样本基因组 DNA 进行 STR 复合扩增,得到扩增产物;检测所述扩增产物,

[0031] 若扩增产物满足如下 1)-5) 全部标准,则待测样本候选为大麻或者候选含有大麻;若扩增产物不满足如下 1)-5) 全部标准,则待测样本候选不为大麻或者候选不含有大麻;

[0032] 所述标准为:

[0033] 1) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 97-112bp 的等位基因片段;

[0034] 2) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 231-249bp 的等位基因片段;

[0035] 3) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 266-273bp 的等位基因片段;

[0036] 4) 含有显 HEX 基团颜色且大小为 163-177bp 的等位基因片段;

[0037] 5) 含有显 HEX 基团颜色且大小为 102-117bp 的等位基因片段。

[0038] 上述方法中,所述 STR 复合扩增反应退火温度为 55.5°C ;

[0039] 所述待测样本为样本的基因组 DNA。

[0040] 本发明的检验系统适合于中国范围内种植的大麻。

[0041] 本发明的实验证明,本发明有如下优点:

[0042] 1、同时扩增大麻 5 个 STR 基因座,比单个基因座的扩增更加高效、快捷,为大麻 STR 基因座的进一步研究、大麻 STR 数据库的建立、案件中大麻的检验鉴定提供了有效的方法;

[0043] 2、优化后的大麻 5 对引物扩增体系能实现平衡扩增、具有高灵敏度和稳定性,利于检验涉毒案件中经常遇到的腐败检材;

[0044] 3、准确率高,采自不同产地的大麻样本,经检测和数据统计分析,能够得到各自在 5 个基因座上的分型。

附图说明

[0045] 图 1 上图为未对大麻 STR 5plex 荧光复合体系进行优化前的扩增情况,下图为进行一系优化后的扩增效果。

- [0046] 图 2 大麻 STR 5plex 荧光扩增系统的灵敏度检测结果
- [0047] 图 3 大麻 STR 5plex 荧光扩增系统的组织同一性检测结果
- [0048] 图 4 大麻 STR 5plex 荧光扩增系统的种属特异性检测结果

具体实施方式

- [0049] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0050] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0051] 实施例 1、STR 复合扩增引物设计
- [0052] 1、设计原则
- [0053] 根据文献报道和遗传基因库,目前已发现了一些大麻 STR 基因座,但并不是所有的这些 STR 基因座都适用于大麻基因相关性分析、DNA 分型及法庭科学毒品原植物检测等方面的研究。依据下列原则筛选合适的大麻 STR 基因座:
- [0054] 1)、基因座的重复序列简单,重复单位为二、三、四或五核苷酸的基因座;
- [0055] 基因座的扩增片段大小在 90-400bp 之间,为了防止基因座之间出现重叠,相同荧光组合的基因座之间至少应有 9-10bp 的间隔;
- [0056] 2)、基因座突变率低(一般不超过 2.80×10^{-3})、多态性好,保证检测结果的稳定性和可靠性;
- [0057] 3)、所选择的各个基因座的引物必须具有兼容性即引物不相互作用,特别是引物 3' 端不能出现互补序列;因为基因座的引物间的特殊序列发生相互作用如出现引物二聚体、发卡结构时会产生非特异性条带或额外带,使产物量下降,甚至是无扩增产物;
- [0058] 4)、各基因座引物长短适中,具有相似的物理特性和反应动力学特点、扩增效率高。复合扩增各个基因座之间的扩增效率的平衡是通过调节引物的浓度来达到一致的;所以尽量选择扩增效率高的基因座,在调节平衡的时候引物浓度的变动范围就比较宽松,从而为扩增效率相对较低的基因座引物的浓度调节提供空间。
- [0059] 5)、所选基因座必须具有高度的种属特异性。
- [0060] 2、STR 复合扩增引物
- [0061] 根据上述基因座选择原则,对文献资料中报道的大麻 STR 基因座的遗传学数据进行研究分析,初步筛选出 5 个大麻核心基因座:P17、P14、P19、P24、P25。
- [0062] 五个 STR 基因座为研究对象,参考文献获得 5 对大麻 STR 基因座的引物序列,通过多引物配对软件 AutoDimer version1.0 对获得的 5 对引物进行发卡结构及二聚体的配对分析,设置 Minimum SCORE(指两个引物间互补配对的碱基对数减去错配的碱基对数所得到的值)为 7,结果表明引物间无稳定的二聚体或者发卡结构,扩增效率高,灵敏度强,引物序列如表 1 所示。
- [0063] 表 1 为 STR 复合扩增引物序列
- [0064]

引物名称	引物序列	5' 端荧光标记	基因片段 大小 bp
P17	(F) 5 CAAATgCCACACCACCTTC 3 (序列 1)	FAM(蓝色)	97-112
	(R) 5 gTAggTAgCCAggTATAggTAg 3 (序列 2)		
P19	(F) 5 TTgATggTggTgAAACggC 3 (序列 3)	FAM	231-249
	(R) 5 CCCCAATCTCAATCTCAACCC 3 (序列 4)		
P25	(F) 5 TggTTTCAGTggTCCTCTC 3 (序列 5)	FAM	266-273

[0065]

	(R) 5 ACgTgAgTgATgACACgAg 3 (序列 6)		
P14	(F) 5 CAACCAAATgAgAATgCAACC 3 (序列 7)	HEX	163-177
	(R) 5 TgTTTTCTTCACTgCACCC 3 (序列 8)		
P24	(F) 5 ggTTgggATgTTgTTgTTgTg 3 (序列 9)	HEX(绿色)	102-117
	(R) 5 AgAAATCCAAggTCCTgATgg 3 (序列 10)		

[0066] 上述 P17、P19、P24 的上游引物 FAM 荧光标记，P14、P25 的上游引物 HEX 荧光标记。引物序列由上海英潍捷基公司合成，带修饰的引物序列一律采用 HPLC 纯化方式进行纯化，未经修饰的引物序列采用 PAGE 方式纯化。

[0067] 实施例 2、STR 复合扩增引物在鉴定大麻中的应用

[0068] 1、基因组 DNA 的提取

[0069] 分别提取大麻花、茎和叶的基因组 DNA。

[0070] 2、STR 复合扩增体系优化

[0071] 以编号为 1 的大麻的花的基因组 DNA 为模板，将 P14、P17、P19、P24 及 P25 引物对混合进行 PCR 扩增，并对扩增体系和反应条件进行优化，具体如下：

[0072] 优化前扩增体系如表 2 所示：

[0073] 表 2 优化前扩增体系

[0074]

试剂名称	加入量	终浓度
5u/μL 金牌酶 (美国 AB 公司)	0.2μL	0.05u/μL
10×PCR 缓冲液 (上海生物工程技术有限公司)	2μL	1×PCR 缓冲液
25mmol/L MgCl ₂	1.2μL	1.5mmol/L
2mmol/L dNTPs	2μL	0.2 mmol/L
10μmol/L 引物 (5 对)	1μL	0.5μmol/L
水		6.7μL
模板		1μL
总体积		20μL
Gold TaqDNA 聚合酶	美国 AB 公司	
10×PCR 反应缓冲液	上海生物工程技术有限公司	
MgCl ₂	上海生物工程技术有限公司	
dNTPs	TaKaRa 公司	

[0075] 优化前 STR 复合扩增反应条件如下：

[0076] 初始变性条件：92-96℃，5-11 分钟；

[0077] 变性条件：91-97℃，30 秒钟 -2 分钟；

[0078] 退火条件：53-62℃，30 秒钟 -2 分钟；

[0079] 延伸条件：65-75℃，30 秒钟 -1 分钟；

[0080] 循环参数：25-30 个循环；

[0081] 终延伸：65-72℃，25-60 分钟；

[0082] 保温：4℃ 维持；

[0083] 优化后扩增体系如表 3 所示。

[0084] 表 3 为优化后扩增体系

[0085]

试剂名称	加入量		终浓度		
5u/μL 金牌酶	0.4μL		0.1u/μL		
10×PCR 缓冲液	2μL		1×PCR 缓冲液		
25mmol/LMgCL2	1.6μL		2.0mmol/L		
2mmol/LdNTPs	2.5μL		0.25 mmol/L		
引物（5 对）混合液	2.5μL		每对引物中各条引物终浓度如下		
水			10.0μL		
模板			1μL		
总体积			20μL		
基因座	P14	P17	P19	P24	P25
引物浓度（μM）	0.3	0.3	0.15	0.15	0.35

[0086] 优化后反应条件为：

[0087] 初始变性条件：95℃，5 分钟；

[0088] 变性条件：94℃，30 秒钟；

[0089] 退火条件：55.5℃，30 秒钟；

[0090] 延伸条件 :72℃,30 秒钟 ;

[0091] 循环条件 :28 ~ 30 次

[0092] 终延伸条件 :72℃,30 分钟 ;

[0093] 保温 :4℃维持。

[0094] 优化前后复合扩增体系结果见图 1 所示, A 图为优化前, B 图为优化后, 可以看出, 优化前复合扩增体系扩增不平衡, 出现大片段基因座的丢失并有较多的非特异性峰和杂带, 优化后的复合体系得到了五个基因座的完整等位基因片段, 扩增图谱清晰明确, 具有良好的平衡性与稳定性。P17 基因座得到 109bp 和 112bp 的等位基因片段, P19 基因座得到 243bp 的等位基因片段, P25 基因座得到 270bp 的等位基因片段, P24 基因座得到 111bp 的等位基因片段, P14 基因座得到 168bp 和 174bp 的等位基因片段。

[0095] P14、P17、P19、P24 及 P25 扩增产物为大麻特异基因座片段, 可用这 5 对引物对检测待测样本是否为大麻或者是否含有大麻, 具体方法如下 :

[0096] 用 5 个引物对组成的复合扩增体系共同对待测样本进行 STR 复合扩增, 检测扩增产物, 若扩增产物满足如下 1)-5) 全部标准, 则待测样本候选为大麻或者候选含有大麻 ; 若扩增产物不满足如下 1)-5) 全部标准, 则待测样本候选不为大麻或者候选不含有大麻 ;

[0097] 所述标准为 :

[0098] 1) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 97-112bp 的等位基因片段 ;

[0099] 2) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 231-249bp 的等位基因片段 ;

[0100] 3) 含有显 FAM 基团颜色且大小为 266-273bp 的等位基因片段 ;

[0101] 4) 含有显 HEX 基团颜色且大小为 163-177bp 的等位基因片段 ;

[0102] 5) 含有显 HEX 基团颜色且大小为 102-117bp 的等位基因片段。

[0103] 因此选用优化后反应体系和优化后反应条件为最佳反应体系和条件, 进行后期实验。

[0104] 3、灵敏度检测

[0105] 将编号为 1 的大麻花的基因组 DNA 依次稀释为 5ng/μL、4ng/μL、3ng/μL、2ng/μL、1ng/μL、0.5ng/μL、0.25ng/μL、0.1ng/μL, 用 5 对大麻 STR 复合扩增引物按照最佳反应体系和最佳反应条件分别进行 PCR 扩增。

[0106] 结果如图 2 所示, 满足上述 2 中所述的标准, 该体系的最小检出量为 0.1ng/μL, 说明其灵敏度为 0.1ng/μL。

[0107] 用 0.05ng/μL 作为模板, 进行反复试验, 结果无法得到可辨认的 STR 荧光图谱。

[0108] 4、同一性检测

[0109] 将编号为 1 的大麻样本花、茎和叶的基因组 DNA 5ng/μL, 用 5 对大麻 STR 复合扩增引物按照最佳反应体系和最佳反应条件分别进行 PCR 扩增。

[0110] 结果如图 3 所示, 可以看出, 该体系具有良好地组织同一性。

[0111] 5、种属特异性

[0112] 选择基因座时很重要的一方面就是要考虑该基因座是否有良好的种属特异性, 对本复合扩增体系来说就是检验建立的大麻 5 个基因荧光复合扩增检测体系能否区分大麻与其他植物检材, 达到对大麻准确鉴别鉴定的目的。

[0113] 在植物学分类中, 大麻属被子植物门木兰纲金缕梅亚纲荨麻目大麻科大麻属, 其

与罂粟、烟草、苜蓿、桑属于同一纲,而且与桑属于同一亚纲、同一目,罂粟也是毒品植物,与虞美人从形态上很难鉴别。这说明它们有比较近的亲缘关系,因此在引物的筛选上就要考虑是否能够区分这些亲缘标本;而且在某些毒品案件中,烟草经常被掺杂在大麻毒品中,或者用烟草做掩护来掩盖大麻。此外,玉米、小麦、水稻等常见的经济作物也可能被用来贩毒,也需要鉴别。

[0114] 将大麻、小麦、桑、烟草、虞美人、罂粟的叶片分别提取基因组 DNA,用上述最佳反应体系和反应条件进行 PCR 扩增。

[0115] 结果如图 4 所示,大麻的扩增产物含有显 FAM 基团颜色且大小为 103/108bp 的等位基因片段;含有显 FAM 基团颜色且大小为 237bp 的等位基因片段;含有显 FAM 基团颜色且大小为 269/272bp 的等位基因片段;含有显 HEX 基团颜色且大小为 110bp 的等位基因片段;含有显 HEX 基团颜色且大小为 164/170bp 的等位基因片段。满足上述 5 种全部标准。

[0116] 而小麦、桑、烟草、虞美人、罂粟均不满足上述 5 种全部标准,在这些非大麻植物中对应基因片段没有出现属于大麻的特异基因片段。

[0117] 上述结果表明,说明本发明的引物及方法可以特异检测大麻。

[0001]

序列表

<110>杭州市公安局上城区分局

<120>大麻遗传标记多态性检测体系

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

caaatgccac accacette

19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

gtaggtagcc aggtataggt ag

22

<210> 3

[0002]

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

ttgatggtgg tgaaacggc

19

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

ccccaatctc aatctcaacc c

21

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

tggtttcagt ggctctctc

19

<210> 6

[0003]

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 6

acgtgagtga tgacacgag

19

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

caaccaaatg agaatgcaac c

21

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

tgtttttcttc actgcaccc

19

<210> 9

[0004]

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 9

ggttgggatg ttgttggtgt g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

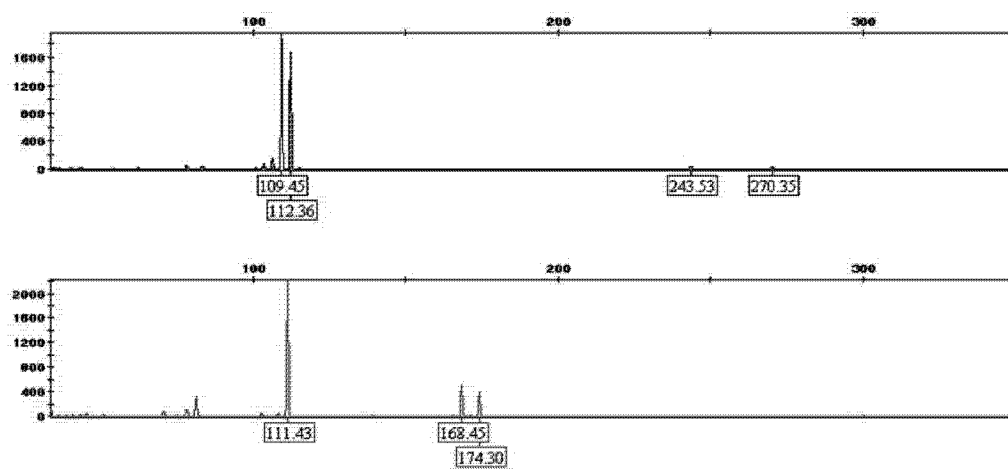
<223>

<400> 10

agaaatccaa ggtcctgatg g

21

A



B

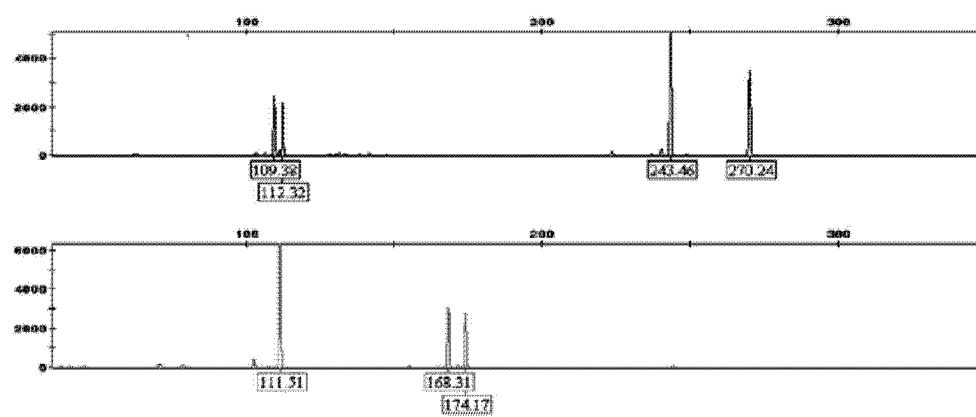
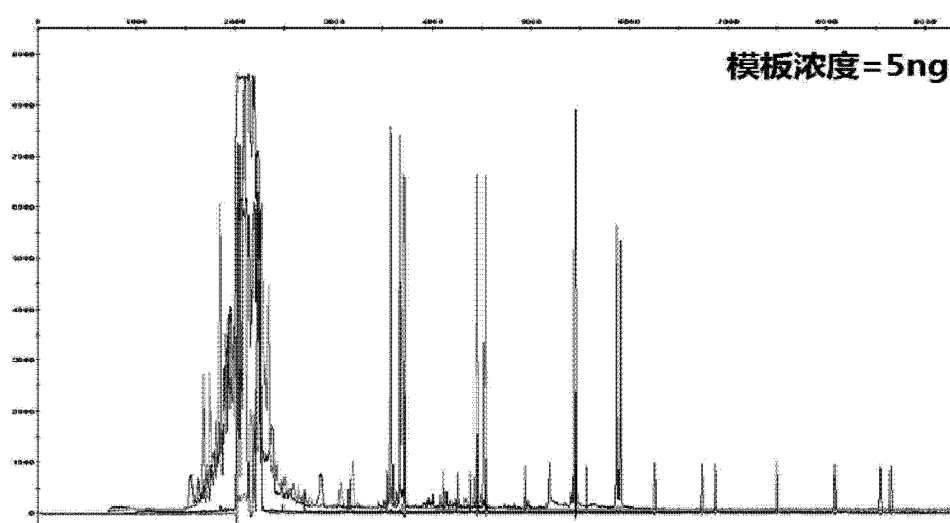
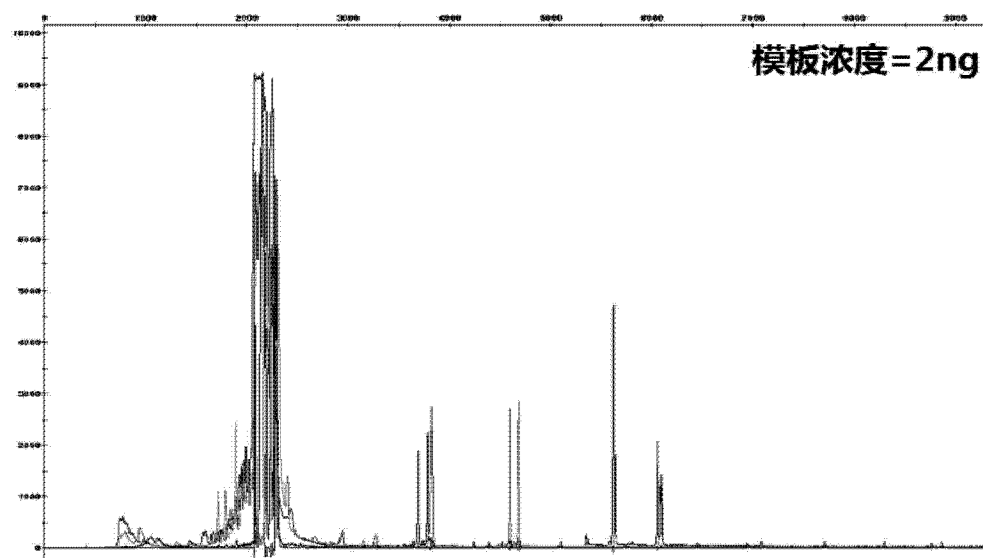
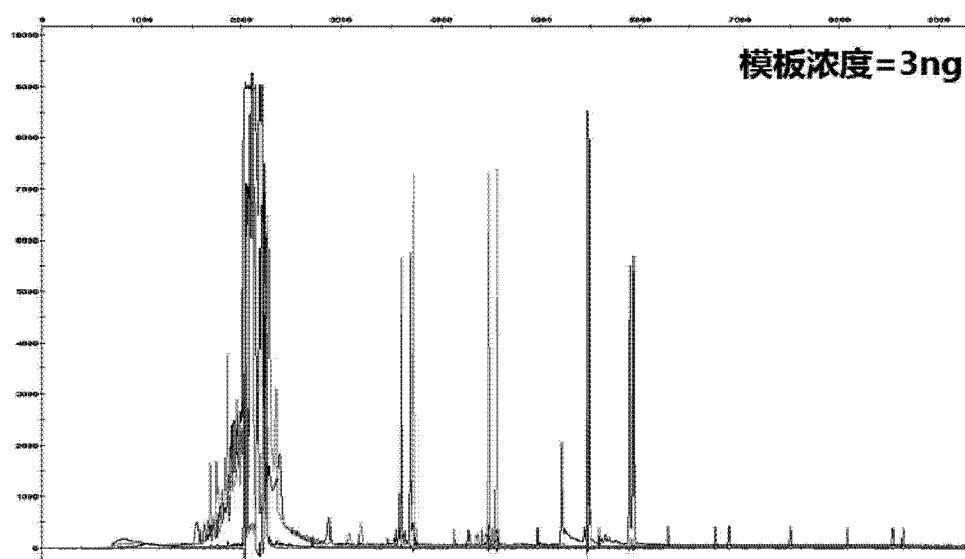
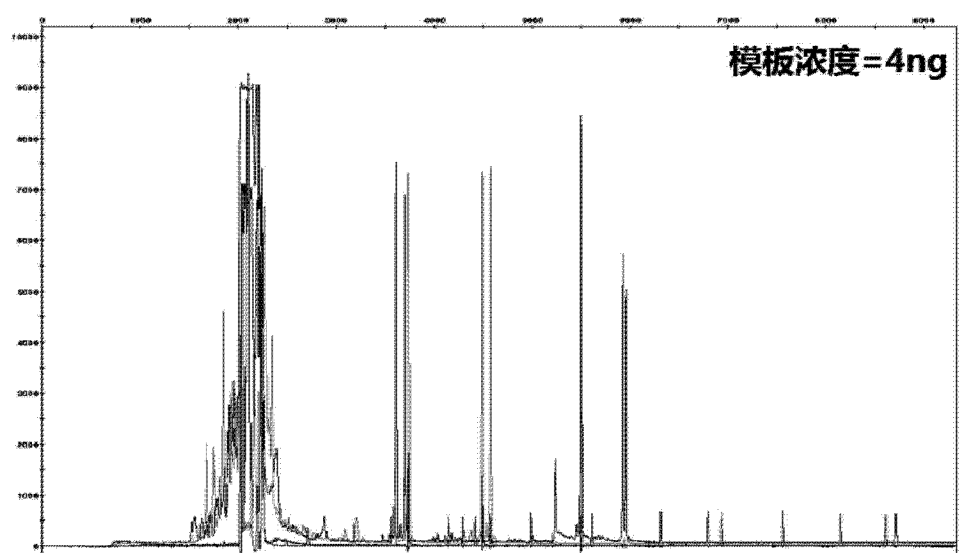
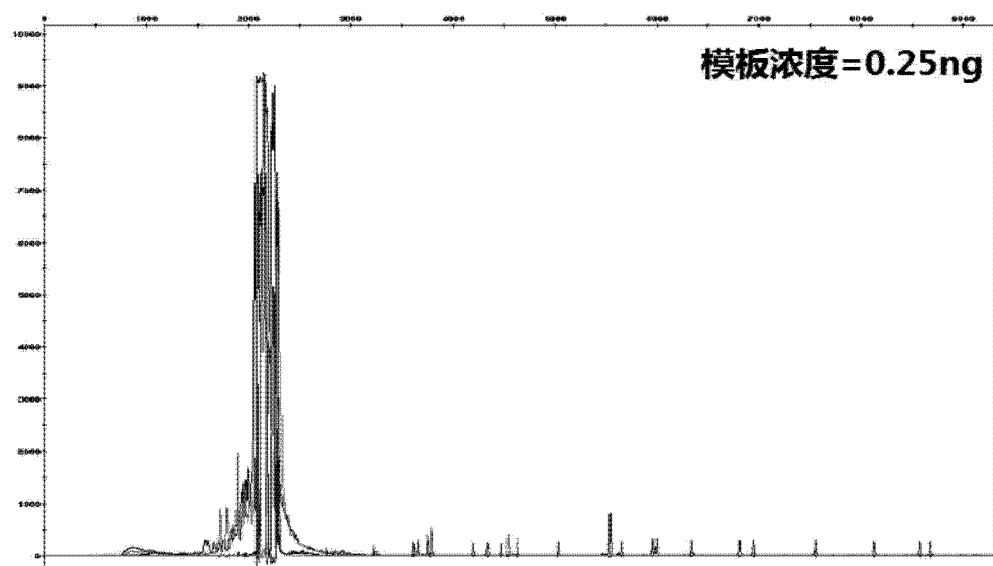
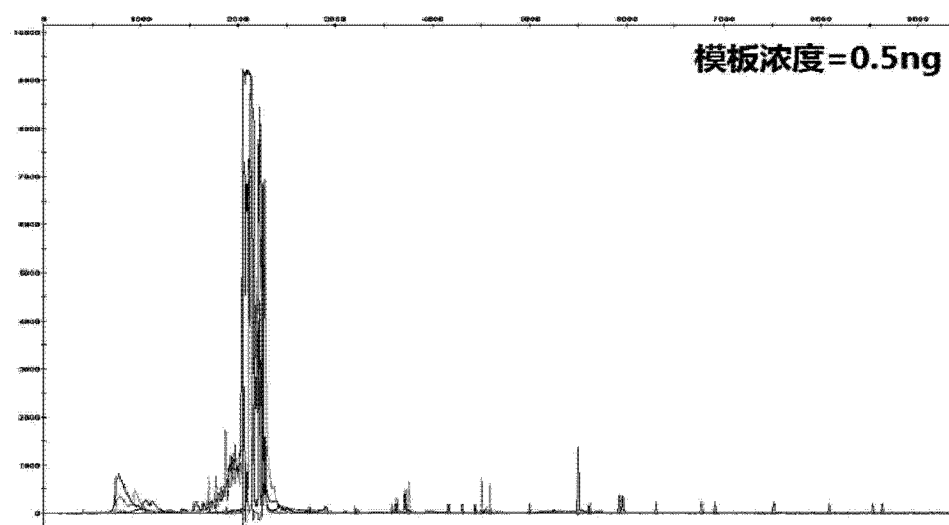
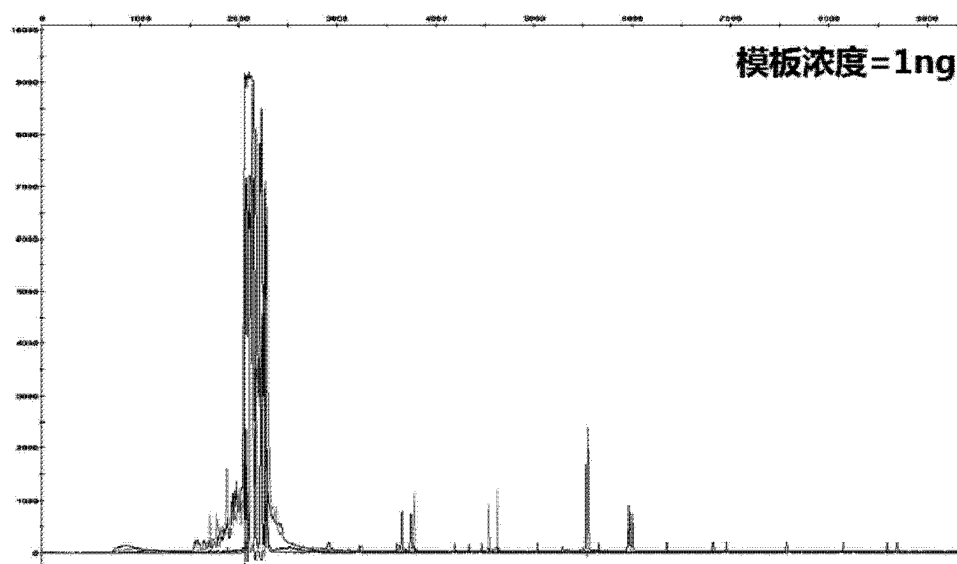


图 1







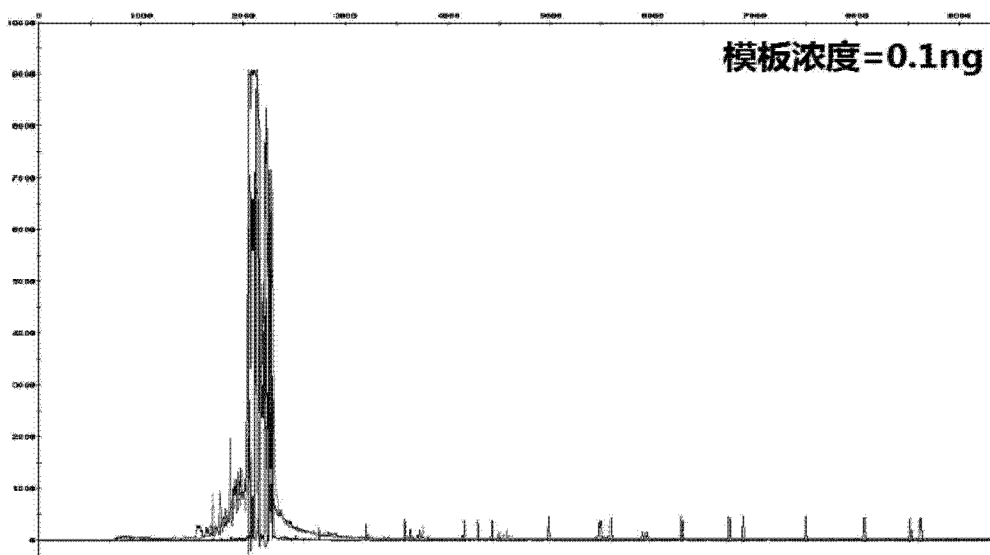
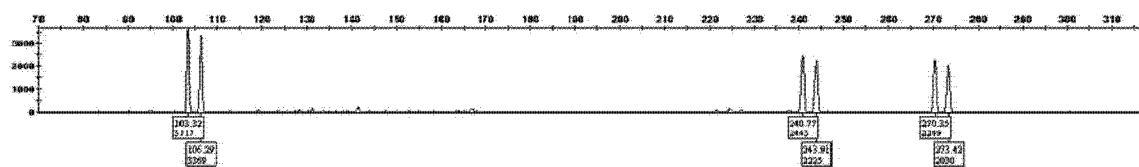
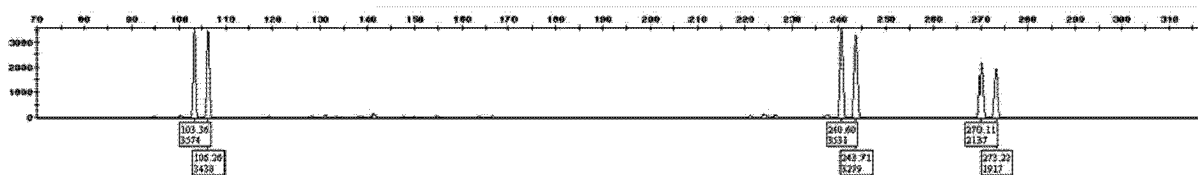
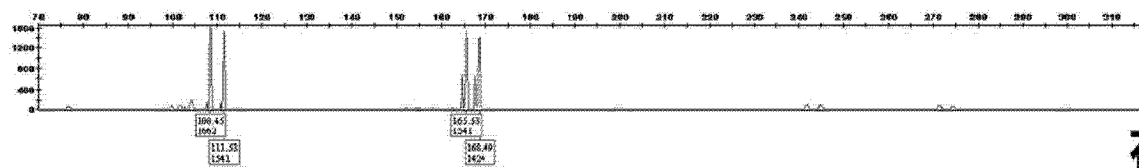


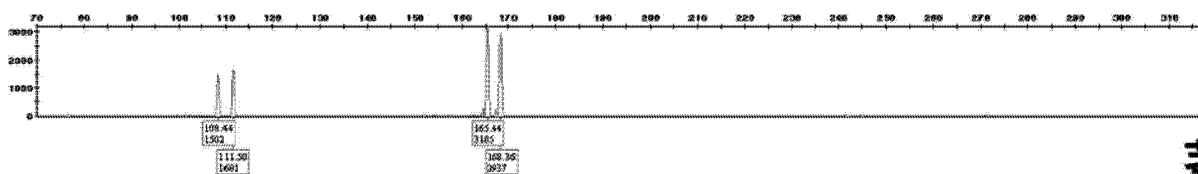
图 2



花



茎



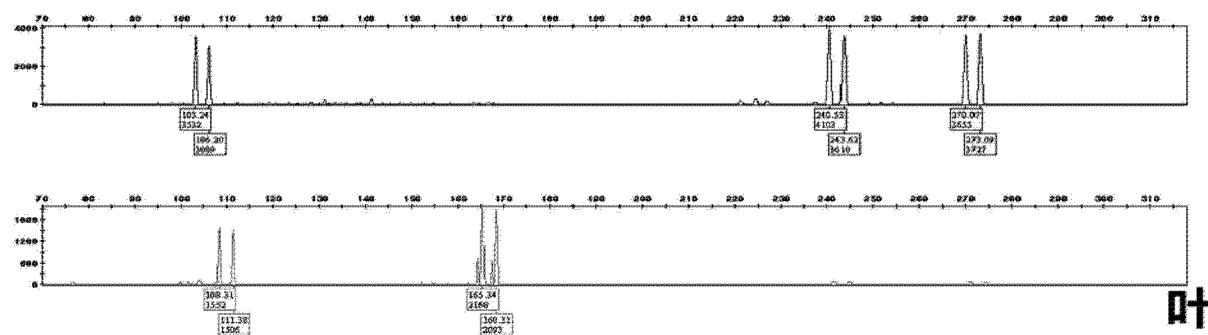
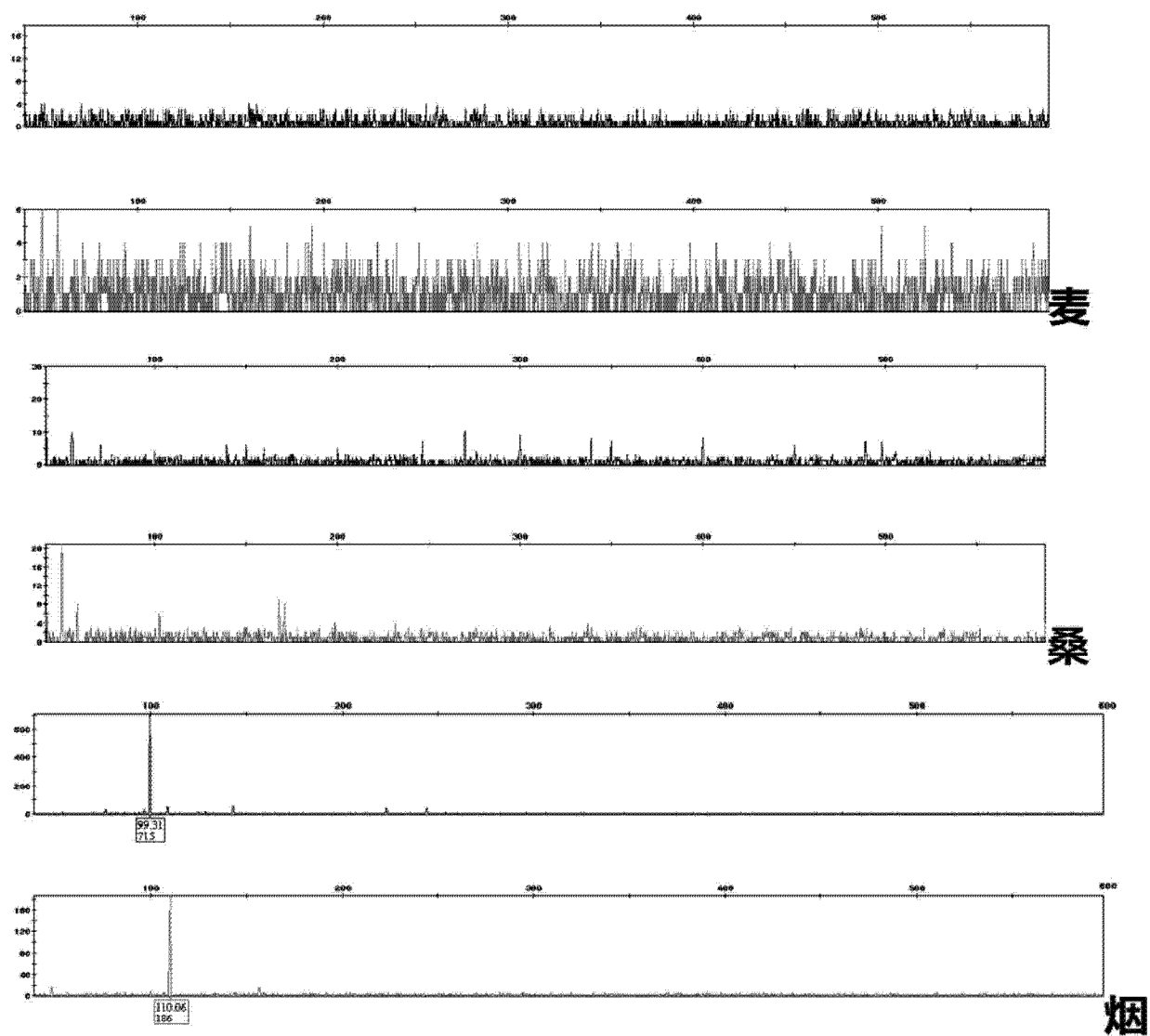


图 3



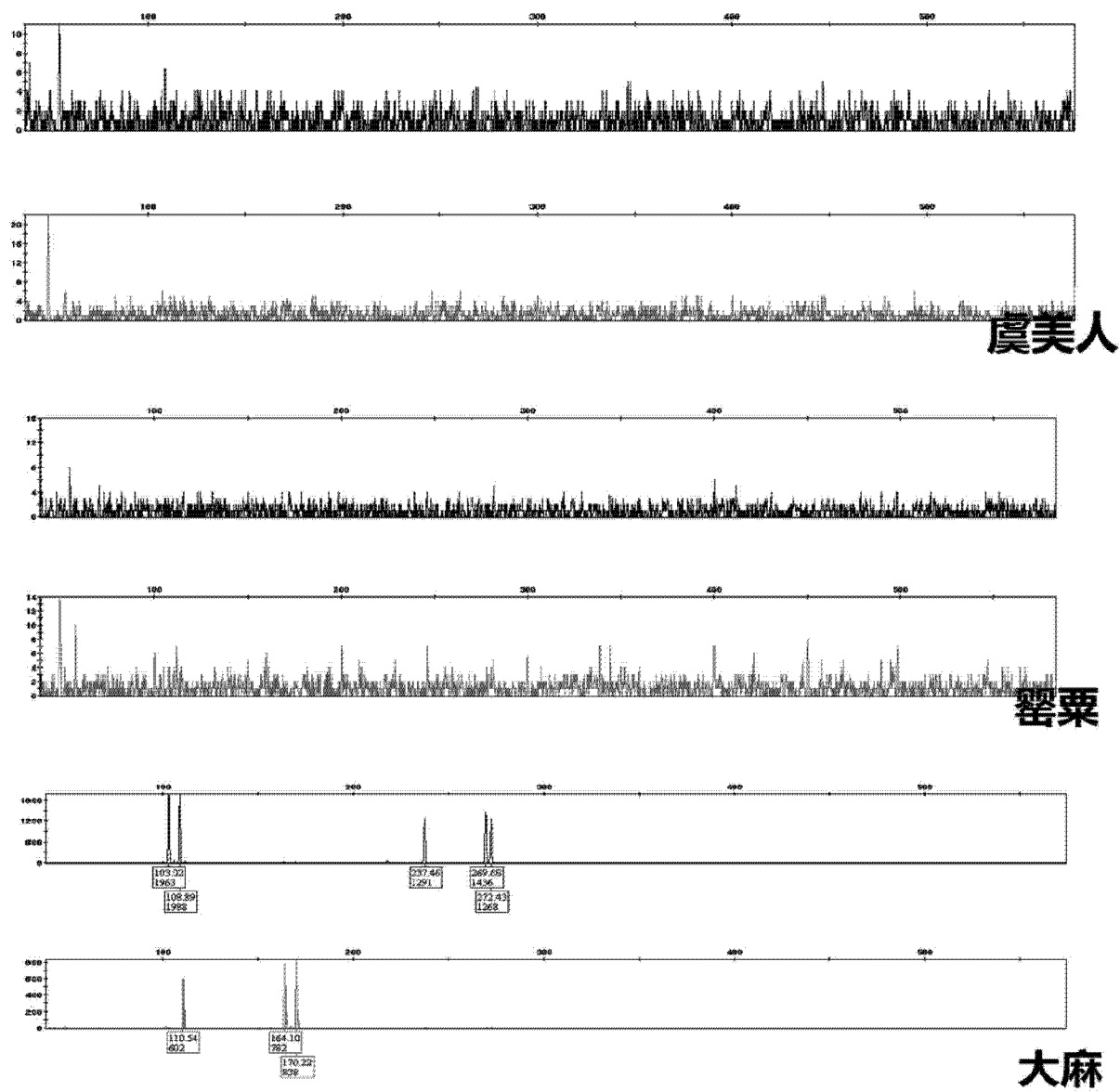


图 4