

检测槟榔缺铁的试剂盒及判断槟榔幼苗缺铁状态的方法

技术领域

本发明属于生物技术领域，尤其涉及一种检测槟榔缺铁的试剂盒及判断槟榔幼苗缺铁状态的方法。

背景技术

目前，铁（Fe）是植物生长所必需的微量元素，对植物的生长和代谢具有不可替代的作用。铁在光合作用、叶绿体发育、叶绿素合成、氮代谢、呼吸作用、酶氧化还原反应等各种重要过程中发挥作用。 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的存在使其适合于氧化还原反应，并在电子转移中起着重要作用。如果过量使用，可能会有潜在的毒性。游离的Fe可通过Fenton反应产生毒性水平的氧自由基和羟基自由基。

荧光定量PCR是1996年由美国Applied Biosystems公司推出的一种新的核酸定量实验技术，它的原理是通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针，对PCR产物进行标记跟踪，实时监控反应过程，通过对产物量的实时分析，最终能够对模板的初始浓度，核酸种类、基因突变类型等信息作出准确的判定。目前，荧光定量PCR在生物学研究及个体化医学基因检测领域有着广泛的应用。

ZIP是一个在植物铁转运中起重要作用的基因，响应植物缺铁，在水稻、玉米、小麦等植物中都得到验证。ZIP基因家族在缺铁的情况下可能会出现差异表达的现象。但现有技术中关于通过通过AcZIP家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法尚未见报道。因此，亟需一种通过差异基因的表达来判断槟榔幼苗是否处于缺铁状态的方法。

通过上述分析，现有技术存在的问题及缺陷为：现有技术中没有详细的通过分子水平来检测槟榔缺铁的状态，大多是以生理生化手段来检验槟榔是否处于槟榔缺铁的状态，并且关于通过AcZIP家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法尚未见报道。

解决以上问题及缺陷的难度为：需要通过多个方面来验证槟榔 ZIP 基因会响应槟榔的缺铁，之后通过响应的程度挑选变化程度相对显著的基因，并且可以与槟榔其他金属离子的变化趋势不一致，来区分特异响应槟榔缺铁的 ZIP 基因。

解决以上问题及缺陷的意义为：通过分子水平上 ZIP 基因的响应情况，反应了槟榔的缺铁的状态，更为准确的说明了槟榔在缺铁情况下的分子响应。

发明内容

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种检测槟榔缺铁的试剂盒及判断槟榔幼苗缺铁状态的方法，尤其涉及一种通过荧光定量 PCR 技术，利用在缺铁处理的差异表达基因，来检测槟榔差异基因表达水平的试剂盒及应用。

本发明是这样实现的，一种快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，所述快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，包括一组基于 ZIP 家族的检测引物以及内参引物。

进一步，所述基于 ZIP 家族的检测引物，包括特异性引物 ZIP1 和特异性引物 ZIP2；其中，所述特异性引物 ZIP1 的核苷酸序列 SEQ ID NO：1 所示，所述特异性引物 ZIP2 的核苷酸序列 SEQ ID NO：2 所示；所述内参引物的核苷酸序列 SEQ ID NO：3 所示。

本发明的另一目的在于提供一种所述快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒在检测槟榔是缺铁还是缺锌中的应用，所述快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒在检测槟榔是缺铁还是缺锌中的应用方法为：

以天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取待测样品的基因组 RNA，逆转录为 cDNA 为模板，使用试剂盒中的 ZIP 基因检测引物与内参引物进行 RT-qPCR 反应，以正常样品为对照，按照 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算相对丰度，得到基因的相对表达量；根据 AcZIP 家族的相对表达量，若 ZIP1 在叶片中和根中的表达量没有显著差异，而 ZIP2 在新叶中表达量急剧下降，在根中没有明显变化，则说

明植株受到缺铁胁迫；其中，所述样品包括槟榔叶片和槟榔主根。

本发明的另一目的在于提供一种应用所述的快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒的通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法，所述通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法包括以下步骤：

步骤一，实验基地进行槟榔缺铁处理：以 Hoagland 为配方，采用水培的方法对一叶期进行适应性培养后的槟榔幼苗进行缺铁处理；

步骤二，样品采集：对出现黄化现象的槟榔幼苗的叶片以及主根进行收集，用 75% 的乙醇擦拭干净，用液氮冻干；

步骤三，ZIP 家族分析：根据已有的植物 ZIP 基因设计引物进行 PCR 扩增，两组 ZIP 基因简单命名为 ZIP1 和 ZIP2；

步骤四，引物设计：根据 ZIP 基因的序列，应用 primer5 软件设计每个基因的特异性引物；

步骤五，引物的特异性验证：以提取的正常样品的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，测序，与核酸序列进行比较，检测该引物的特异性；

步骤六，实时荧光定量 PCR：采用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR 检测以及熔解曲线分析，再一次验证扩增的特异性。

进一步，步骤一中，所述实验基地进行槟榔缺铁处理，包括：

在实验基地以 Hoagland 为配方，采用水培的方法对一叶期进行适应性培养后的槟榔幼苗进行缺铁处理，每隔一周时间进行培养液的更换，直到槟榔幼苗出现明显的表型；其中，缺铁的槟榔幼苗的新叶出现叶片全部黄化。

进一步，步骤二中，所述样品的采集，包括：

对出现黄化现象的槟榔幼苗的叶片以及主根进行收集，用 75% 的乙醇擦拭干净，用液氮冻干，用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取样品的 RNA，cDNA 合成根据反转录试剂盒操作进行，-20℃ 冻存。

进一步，步骤五中，所述引物的特异性验证，包括：

以提取的正常样品的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，扩增的目的条带的大小分别为 229bp 和 100bp；回收 PCR 产物，连接 T 载，进行测序，与 ZIP1 和 ZIP2 的核酸序列进行比较，以检测该引物的特异性。

其中，所述 ZIP1 的核苷酸序列 SEQ ID NO: 4 所示，所述 ZIP2 的核苷酸序列 SEQ ID NO: 5 所示。

进一步，步骤五中，所述普通的 PCR 反应体系如下：

总反应体系 25 μ L：

2*Vazyme LAMP Master Mix: 12.5 μ L；

ZIP-F: 1 μ L；

ZIP-R: 1 μ L；

cDNA: 1 μ L；

ddH₂O: 9.5 μ L。

所述普通 PCR 反应程序：94℃预变性 4min；94℃变性 30s，54℃退火 30s，72℃延伸 45s，共 35 个循环；72℃补充延伸 10min；PCR 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测。

进一步，步骤六中，所述实时荧光定量 PCR 检测，包括：

利用 iTaq™ Universal SYBR Green Supermix，即 Bio-RAD 试剂盒及 ZIP 基因检测引物、内参引物，采用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR 检测；荧光定量 PCR 结束后对结果进行熔解曲线分析，再次验证扩增的特异性。

进一步，步骤六中，所述实时荧光定量 PCR 的过程中，扩增程序为：95℃预变性 15min；95℃变性 10s；60℃退火 30s；共 40 个循环；PCR 完成后按 0.1℃s⁻¹ 升温速率从 72℃上升至 95℃进行溶解曲线的分析验证；采用实时荧光定量 PCR 仪进行；循环结束后，采用仪器自带的分析软件，分析扩增结果。

每个 qPCR 反应重复三次；记录 qPCR 反应体系的 Ct 值；根据 2^(-ΔΔCt) 计算基因在不同处理下的相对表达量，ZIP1 在叶片中和根中的表达量没有显著差异，而 ZIP2 在新叶中表达量急剧下降，在根中没有明显变化。

结合上述的所有技术方案，本发明所具备的优点及积极效果为：本发明提供的快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，利用缺铁处理引起基因表达量的差异，根据差异基因在不同处理的表达量的趋势变化不同，得到检测槟榔缺铁的检测引物；试剂盒内的检测引物具有很高的特异性，只需提供正常的样品以及出现黄化的样品，然后通过实时荧光定量 PCR 技术判断槟榔幼苗是否缺铁的情况，以便对后续处理提供依据。

本发明的目的是提供了一种通过 AcZIP 差异性表达来判断槟榔幼苗缺铁状态的试剂盒及应用，该试剂盒包含了一组 AcZIP 表达水平检测引物，一对槟榔内参基因。该试剂盒通过槟榔对缺铁和缺锌的响应，引起的槟榔相关基因的差异表达，以此来确定槟榔缺铁，具有特异性强、易于操作、结果可靠的特征，具有极大的潜在应用价值。本发明开发的基于 ZIP 家族的实时荧光定量的槟榔缺铁的诊断试剂盒，只需提供样品，按照所提供的方法进行检测，即可确定槟榔幼苗是否缺铁，为后续预防提供依据。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对本发明实施例中所需要使用的附图做简单的介绍，显而易见地，下面所描述的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 是本发明实施例提供的通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法流程图。

图 2 是本发明实施例提供的利用引物进行 PCR 验证引物特异性的凝胶成像验证图。

图 3 是本发明实施例提供的利用荧光定量 PCR 方法检测槟榔基因相对表达量的结果图。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

针对现有技术存在的问题，本发明提供了一种通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法，下面结合附图对本发明作详细的描述。

本发明实施例提供的快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒，包括一组基于 ZIP 家族的检测引物以及内参引物。

本发明实施例提供的基于 ZIP 家族的检测引物，包括特异性引物 ZIP1 和特异性引物 ZIP2；其中，所述特异性引物 ZIP1 的核苷酸序列 SEQ ID NO: 1 所示，所述特异性引物 ZIP2 的核苷酸序列 SEQ ID NO: 2 所示；所述内参引物的核苷酸序列 SEQ ID NO: 3 所示。

如图 1 所示，本发明实施例提供的通过 AcZIP 家族基因差异性表达判断槟榔幼苗缺铁状态的方法包括以下步骤：

S101，实验基地进行槟榔缺铁处理：以 Hoagland 为配方，采用水培的方法对一叶期进行适应性培养后的槟榔幼苗进行缺铁处理；

S102，样品采集：对出现黄化现象的槟榔幼苗的叶片以及主根进行收集，用 75% 的乙醇擦拭干净，用液氮冻干；

S103，ZIP 家族分析：根据已有的植物 ZIP 基因设计引物进行 PCR 扩增，两组 ZIP 基因简单命名为 ZIP1 和 ZIP2；

S104，引物设计：根据 ZIP 基因的序列，应用 primer5 软件设计每个基因的特异性引物；

S105，引物的特异性验证：以提取的正常样品的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，测序，与核酸序列进行比较，检测该引物的特异性；

S106，实时荧光定量 PCR：采用荧光定量 PCR 仪对 cDNA 模板进行荧光定量 PCR 检测以及熔解曲线分析，再一次验证扩增的特异性。

下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步描述。

本发明开发了一个基于 ZIP 家族的实时荧光定量的槟榔缺铁的诊断试剂盒，只需提供样品，按照所提供的方法进行检测，即可确定槟榔幼苗是否缺铁，为后续预防提供依据。

本发明的目的是提供了一种通过 AcZIP 差异性表达来判断槟榔幼苗缺铁状态的试剂盒及应用，该试剂盒包含了一组 AcZIP 表达水平检测引物，一对槟榔内参基因。该试剂盒通过槟榔对缺铁和缺锌的响应，引起的槟榔相关基因的差异表达，以此来确定槟榔缺铁，具有特异性强、易于操作、结果可靠的特征，具有极大的潜在应用价值。

本发明采用的技术方案是：

本发明提供了一种快速检测槟榔缺铁的实时荧光定量试剂盒，所述试剂盒包括一组基于 ZIP 家族的检测引物、以及内参引物。

本发明的完整步骤：

1、实验基地进行槟榔缺铁处理

在实验基地以Hoagland为配方，采用水培的方法对一叶期进行适应性培养后的槟榔幼苗进行缺铁处理，每隔一周时间进行培养液的更换，直到槟榔幼苗出现明显的表型。如图2-3所示，缺铁的槟榔幼苗的新叶出现叶片全部黄化。

2、样品的采集

对出现黄化现象的槟榔幼苗的叶片以及主根进行收集，用75%的乙醇擦拭干净，用液氮冻干，用天根多糖多酚植物总RNA提取试剂盒提取样品的RNA，cDNA合成根据TaKaRa公司反转录试剂盒操作进行，-20℃冻存。

3、ZIP家族分析

ZIP家族（PF02535）在植物铁转运中起到重要作用。根据已有的植物ZIP基因设计引物进行PCR扩增，两组ZIP基因简单命名为ZIP1和ZIP2。

4、引物设计

根据ZIP基因的序列，应用primer5软件设计每个基因的特异性引物。

ZIP1-F: TGAGCCCTGGTTCTACCTCACTCGC

ZIP1-R: GCCGCAAAGGACTTGGAGAAGACGA

ZIP2-F: CGTGCCTCAAGGACAACCCG

ZIP2-R: CGATGCCCAACTCCAAGACC

内参引物 Actin-F: GTATCGTGCTTGATTATGG;

Actin-R: GCTACTCTTGGCTGTCTCC

其中，所述引物对中的两条单链DNA既可分贝单独包装，也可等摩尔混合包装。

5、引物的特异性验证

以提取的正常样品的cDNA为模板，进行PCR扩增，扩增的目的条带的大小分别为229bp和100bp。回收PCR产物，连接T载，寄送至生工生物工程（上海）股份有限公司，进行测序，与下列的核酸序列进行比较，以检测该引物的特异性。

ZIP1的序列：

ATGTCTTTCTTTGAGGATCTTGAGCCCTGGTTCTACCTCACTCGCTTCC
GCGACCAGCTGAGCGTTTTCTCTGAAACCATGTCAGCATCGATGGCGACG
GCGAGCTGCACCGACGACGCGGCGGACGAGTGCCGCGATGACGCGGCGG
CGCTGCGGCTGAAAATGGTAGCGATAGTGACGATCCTTGTGGCGGGGGTG
ACCGGGGTGACGATCCCCCTGGTGGGGCGCAAGCGGCGGTTACTGCGCAC
CGACGGCGGCCTCTTCGTCTTCTCCAAGTCCTTTGCGGCCGGCGTCATCCT
TGCAACGGGGTTCGTCCACATGCTCCACGACGCCCAGTCGTCGCTGACGG
ACCCCTGCCTCCCGGAGTCGCCATGGCGGCGATTCCCGTTCTCCGGCTTCG
TGGCAATGATGGCGGCGCTGGGGACCCTCTTGGTCGACTTCGTCGGGACT
CAGTTCTACGAGCGGAAGCACCGGGAAGAGGCCAGGGGGGTCAAGGCGG
CCACCGTGGCGGCGGTTGAGGCGGCGACAGCGGCCGAGGAGGATATCAC
CGTCATCTCGGTCTCGCCGGAGCCGGAAGAGGCGGCGGACGGCGTCAAG
AGCCCGATGCACATTGTGGGGATGCACGCCACGCGGCGGCGCACCGGCA

TAGCCACCCCTACGAGCACGGGGCGTGCGACGGCCCCGCGCTGCGGGAAC
GCGTCCCTGGCCACGCCACGAGGACGAGGGCGTGGGCGAGGTCCCTTCT
CATGTGCGCCACGTGGTTCGTATCCCAGATACTGGAAGTAGGAATCGTGTCC
CACTCGGTGATCATCGGGTTGTCACTCGGTGTCTCCCGGAGTCCGTGCACC
ATAAGGCCACTCATTGCAGCCTTATCCTTCCACCAGTTCTTCGAAGGCTTC
GCATTGGGTGGATGCATCTCCCAGGCACAGTTCAGGAACTTGTCGGCCGC
GCTGATGGCGTGCTTCTTTGCGATCACGACGCCGACCGGCATCGGCGTCGG
AGCGGGTGTTGCGTCGTTCTACAACGCCAACAGCCCGAGGGCGCTGGTGG
TGGAGGGGATACTGGACTCGATATCCGCCGGCATTCTCATCTACATGGCATT
GGTTGATCTAATCGCGGCGGATTTTCTTAGCAGGAGGATGAGCTGCAATGT
TAGGCTTCAGGTGGCGTCTTACATGGCCCTTTTTCTTGGCGCTGGTTCCATG
TCCGCCCTCGCAGTCTGGGCTTGA

ZIP2的序列:

ATGAGACCCCTGGCCCTTCTCTTCCTCCTCTCCCTCCTCCTATTGCCTC
TTTTACCGTCGTCGCCGGAGACTGCGACTGCTCCGCCGACGAGGAGGAC
CGCAGCAAATCCAAAGCCCGGCCGCTCAAATCGCCGCGTTCTTCTCCATC
CTCGTCTGCGGCGCCATTGGCGTCTGCCTCCCCTCTTGAGCAAATACATC
CCCGCTCTCAGTCCCGAGAAGGATATCTTCTTCGTGATCAAAGCCTTCGCC
GCCGGCGTCATACTCGCCACGGGATTCATCCACATACTTCCGGACGCTTTC
GACAACCTGACATCGCCGTGCCTCAAGGACAACCCGTGGGGGAAGTTTCC
GTTCGCTGGATTCGGGGCCATGCTTGGTGCCCTCGGGACGCTGATGGTGGA
CGCTGTGGCGACGAGCTATTTAGCCGGTCGGTGACGGCGGCGATCGATG
GTGATGACAAAGGGGATGAGGGGGTGACTGCACCTGCGGGAGAGTATGTG
GTCCACGTCCACGCCACGCACGGGCATGCTCATGGGCCCTCCACCGATGG
CTCGGAGAAGCTCGTCCGCCATCGCGTCATCTCCCAGGTCTTGGAGTTGGG
CATCGTGGTCCATTCGGTAATAATTGGGATATCTCTGGGTGCATCGGATAGT
CCCTCTACCATAAGGCCCTGGTAGCAGCTTTGAGCTTTCATCAATTCTTTG
AGGGCATGGGGCTTGGGGGATGTATTGCTCAGGCAAATTTTAAAATCAAGT
CAACGGCAACAATGATCCTCTTCTTCTCCCTCACCCTCCCGTTGGAATAG

CAATCGGTTTTGGAATATCATCGGTTTACAATGAGAATAGCCCCACTGCTCT
AATTGTCTGAAGGTTGTCTCAATTCAGTAGCTGCTGGAATTTTAATCTACATG
GCTCTTGTTGATCTTCTAGCTGAAGATTTTATGAACCCAAAGGTACAGAGC
AGGGGAAAGCTACAATTGGGGATAAATGTCTCCCTCCTTATAGGAGCAGGC
TTGATGTCACCTTCTTGCTAAATGGGCATAG

普通的PCR反应体系（总反应体系25 μ L）其中具体体系如下：

2*Vazyme LAMP Master Mix: 12.5 μ L

ZIP-F: 1 μ L

ZIP-R: 1 μ L

cDNA: 1 μ L

ddH₂O: 9.5 μ L

普通PCR反应程序：94℃预变性4min；94℃变性30s，54℃退火30s，72℃延伸45s，共35个循环；72℃补充延伸10min。PCR扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳检测。

6、实时荧光定量PCR

利用iTaTMq Universal SYBR Green Supermix（Bio-RAD）试剂盒及本发明ZIP基因检测引物、内参引物，采用荧光定量PCR仪对cDNA模板进行荧光定量PCR检测。荧光定量PCR结束后对结果进行熔解曲线分析，再一次验证扩增的特异性。

荧光定量体系如下（总反应体系20 μ L）：

LightCycler SYBR Green I Master（2*）: 10 μ L

上游引物-F: 0.5 μ L

下游引物-R: 0.5 μ L

模板: 1 μ L

ddH₂O: 加水至总体积20 μ L

所述实时荧光定量PCR的过程中，扩增程序为：95℃预变性15min；95℃变性10s；60℃退火30s；共40个循环。PCR完成后按0.1℃s⁻¹升温速率从72℃上升至95℃进行溶解曲线的分析验证。采用实时荧光定量PCR仪进行。循环结束后，采

用仪器自带的分析软件，分析扩增结果。

每个qPCR反应重复三次。记录qPCR反应体系的Ct值。根据 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算基因在不同处理下的相对表达量，可以看出ZIP1在叶片中和根中的表达量没有显著差异，而ZIP2在新叶中表达量急剧下降，在根中没有明显变化。

ID	CKL1	-FeL1	CKR	-FeR
ZIP1	15.13932	9.208724	23.40613	20.99923
ZIP2	68.36016	58.76612	66.10499	26.93149

本发明所用RNA提取方法、反转录方法以及所用试剂皆可在确认原理的情况下进行替换。

本发明通过结构域的差异获得ZIP家族基因，并通过实时荧光定量PCR验证，获得可以判断槟榔处于缺铁状态的AcZIP基因。引物凝胶成像以及熔解曲线说明了引物的特异性，而实时荧光定量PCR结果提供了依据。

本发明试剂盒以天根多糖多酚植物总RNA提取试剂盒提取样品的RNA，cDNA合成根据TaKaRa公司反转录试剂盒操作进行，利用iTaTMq Universal SYBR Green Supermix（Bio-RAD）试剂盒及本发明ZIP基因检测引物、内参引物，采用荧光定量PCR仪对cDNA模板进行荧光定量PCR检测。

本发明还提供所述ZIP基因的实时荧光定量PCR检测试剂盒在检测槟榔是缺铁还是缺锌中的应用，所述应用的方法为提取待测样品的基因组RNA，逆转录为cDNA为模板，使用试剂盒中的ZIP基因检测引物与内参引物进行RT-qPCR反应，以正常样品为对照，按照 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算相对丰度，得到基因的相对表达量。根据AcZIP家族的相对表达量，若ZIP1在叶片中和根中的表达量没有显著差异，而ZIP2在新叶中表达量急剧下降，在根中没有明显变化，则说明植株受到缺铁胁迫。

本发明中，提取待测样品的RNA以及反转的方法不受限制，可以采用任何已知的提取方法或者试剂盒进行。

本发明所述的样品包括槟榔叶片和槟榔主根。

本实验利用缺铁处理引起基因表达量的差异，根据差异基因在不同处理的表达量的趋势变化不同，得到检测槟榔缺铁的检测引物；试剂盒内的检测引物具有很高的特异性，只需提供正常的样品以及出现黄化的样品，然后通过实时荧光定量PCR技术判断槟榔幼苗是否缺铁的情况，以便对后续处理提供依据。

在本发明的描述中，除非另有说明，“多个”的含义是两个或两个以上；术语“上”、“下”、“左”、“右”、“内”、“外”、“前端”、“后端”、“头部”、“尾部”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系，仅是为了便于描述本发明和简化描述，而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作，因此不能理解为对本发明的限制。此外，术语“第一”、“第二”、“第三”等仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性。

以上所述，仅为本发明的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

<110> 海南大学

<120> 检测槟榔缺铁的试剂盒及判断槟榔幼苗缺铁状态的方法

<160> 5

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

tgagccctggttctacctcactcgc

gccgcaaaggacttgagaagacga

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

cgtgcctcaaggacaacccg

cgatgcccaactccaagacc

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

gtatcgtgcttgattatgg

gctactcttggtgtctcc

<210> 4

<211> 1230

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

基因序列表

atgtctttctttgaggatcttgagccctgggtctacctcactcgcttccgcgaccagctgagcggtttctctgaaacat
gtcagcatcgatggcgacggcgagctgcaccgacgacgcggcgagtgccgcgatgacgcggcggtgctgcg
gctgaaaatggtagcgatagtgacgatccttggtgggggggtgaccggggtgacgatccccctgggtggggcgcaagcg
gcggttactgcgcaccgacggcggtctctctctccaagtccttgcggccggcgatccttgcaacgggggttcgtc
cacatgctccacgacgcccagtcgtcgctgacggaccctgcctcccgagtcgcatggcgggcattcccgttctccg
gcttcgtggcaatgatggcggtgctggggaccctcttggtcgacttcgtcgggactcagttctacgagcggaagcaccgg
gaagaggccaggggggtcaaggcgccaccgtggcggttgaggcgcgacagcgccgaggaggatatacc
gtcatctcgggtctcgccggagccggaagaggcggtgacggcggtcaagagcccgatgcacattgtggggatgcacgc
ccacgcggcgccgacccggcatagccaccctacgagcacggggcggtgcgacggccccgcgtgcgggaacgcgt
ccctggccacgcccacgaggacgagggcggtggcgaggtcccttctcatgtgcgccacgtggtcgtatcccagatactg
gaactaggaatcgtgtccactcggtgatcatcggtgtgactcggtgtctcccgagtcctgcaccataaggccactc
attgcagccttatecttccaccagttcttgaaggcttcgattgggtggatgcattctccaggcacagttcaggaactgtc
ggccgcgctgatggcggtgcttcttgcgatcacgacgccgaccggcatcggtcgagcggtgttcgctcgttctaca
acgccaacagcccagggcggtggtggaggggatactggactcgatatccgccggcattctcatctacatggcattg
gttgatctaatecgcggtgattttcttagcaggaggatgagctgcaatgttaggcttcaggtggcgctttacatggccctttt
cttggcgctggttccatgtccgcctcgcagtctgggcttga

<210> 5

<211> 1047

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

atgagaccctggcccttctcttctctctctctctctattgcctcttttcaccgtcgtcgccggagactgcgactg
ctccgccgacgaggaggaccgcagcaatccaaagcccggcgctcaaaatcgccgcgttcttctccatcctcgtctgcg
gcgccattggcgctctgcctcccactcttgagcaaatacatccccgctctcagtcgccgagaaggatatcttctcgtgatcaaa
gccttcgccgcggcgatcactcgccacgggattcatccacatacttcggacgcttgcgacaacctgacatcgccgtgc
ctcaaggacaaccgctgggggaagttccgttcgctggattcggggccatgcttgggtgcctcgggacgctgatggtgga
cgctgtggcgacgagctatttcagccggtcggtagcgggcgatcgatggtgatgaaaaggggatgaggggggtgac
tgcacctgcgggagagtatgtggtccacgtccacgccacgcacgggcatgctcatgggccctccaccgatggctcggag
aagctcgtccgccatcgcgctcatctcccaggcttggagttgggcatcggtggtccattcggttaataattgggatatctctggg

基 因 序 列 表

tgcacggatagtcctctaccataaggcccctggtagcagctttgagctttcatcaattctttgagggcatggggcctgggg
gatgtattgctcaggcaaattttaaaatcaagtcaacggcaacaatgatcctcttcttccctcaccactcccgttggaatag
caatcggttttggaatatcatcggtttacaatgagaatagccccactgctctaattgtcgaagggtgtctcaattcagtagctgc
tggaattttaatctacatggctcttgatcttctagctgaagattttatgaacccaaagggtacagagcaggggaaagctaca
attggggataaatgtctccctccttataggagcaggcttgatgtcacttcttgctaaatgggcatag