



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108103233 A

(43)申请公布日 2018.06.01

(21)申请号 201810130128.8

(22)申请日 2018.02.08

(71)申请人 苏州百源基因技术有限公司

地址 215163 江苏省苏州市苏州高新区科  
技城锦峰路8号

(72)发明人 张镭 徐红 刘宇琴 车团结

沈颂东 陈游 石文 李亚鹏

(74)专利代理机构 北京中恒高博知识产权代理

有限公司 11249

代理人 吕玉博

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12Q 1/686(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表1页 附图7页

(54)发明名称

用于检测花生DNA的特异性引物和探针及实时荧光定量PCR试剂盒

(57)摘要

本发明提供用于检测花生DNA的特异性引物和探针,所述探针序列为:5'-AAGTCATCAGCAGCCACGGAA-3';所述特异性引物为下述序列或为下述序列的互补链序列:上游引物序列为5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3';下游引物序列为5'-TGTTCCCACTCTTGTCT-3'。本发明还提供相应的实时荧光定量PCR试剂盒。本发明的特异性引物和探针以及相应试剂盒能够用于花生的实时荧光定量PCR检测,且所建立的方法具有高敏感性和高特异性,能够从花生、胡麻、玉米、大豆、土豆、芝麻、油菜、核桃、葵花、橄榄等多种油料作物中特异性鉴别花生油。

1. 用于检测花生DNA的特异性引物和探针,其特征在于:所述探针序列为:5' - AAGTCATCAGCAGCCACGGAA-3' ;

所述特异性引物为下述序列或为下述序列的互补链序列:

上游引物序列为5' -ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3' ;

下游引物序列为5' -TGTTCCCCACTCTTGTCT-3' 。

2. 根据权利要求1所述的特异性引物和探针,其特征在于:探针中5' 端标记的荧光报告基团为FAM、TET、JOE、HEX、VIC中的一种,3' 端标记的荧光淬灭基团为TAMRA、DABCYL、BHQ中的一种。

3. 根据权利要求1所述的特异性引物和探针,其特征在于:所述上游引物和所述下游引物为向5' 端和3' 端方向延伸一至数个碱基或删减一至数个碱基得到的序列。

4. 一种用于检测花生DNA的实时荧光定量PCR试剂盒,其特征在于:所述实时荧光定量PCR试剂盒包括权利要求1-3任一项所述的特异性引物和探针。

5. 根据权利要求4所述的实时荧光定量PCR试剂盒,其特征在于:在10 $\mu$ l PCR反应体系中,所述上游引物的用量为0.1 $\mu$ l,所述下游引物的用量为0.1 $\mu$ l,所述探针的用量为0.2 $\mu$ l。

6. 根据权利要求4或5所述的实时荧光定量PCR试剂盒,其特征在于:所述实时荧光定量PCR试剂盒还包括系列浓度标准品和阳性对照;所述系列浓度标准品是将花生Arah1rDNA基因与载体连接,转化至感受态细胞中诱导表达,提取重组质粒,将重组质粒定量后稀释,得到系列浓度标准品。

7. 根据权利要求6所述的实时荧光定量PCR试剂盒,其特征在于:所述标准品的核苷酸序列为序列表中序列1。

8. 权利要求1-3任一所述的特异性引物和探针、权利要求4-7任一所述的实时荧光定量PCR试剂盒在如下任一中的应用:

- (1) 定性或定量检测或辅助检测花生DNA;
- (2) 制备定性或定量检测或辅助检测花生DNA的产品;
- (3) 定性或定量检测或辅助检测植物油中是否含有花生油;
- (4) 制备定性或定量检测或辅助检测植物油中是否含有花生油的产品。

9. 一种检测或辅助检测植物油中是否含有花生油的方法,其特征在于:分别以系列浓度标准品和待测样品DNA为模板,利用特异性引物和探针进行实时荧光定量PCR,绘制标准曲线,通过标准曲线和待测样品的Ct值判定结果。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于:所述实时荧光定量PCR的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2分钟,94 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 40s并收集荧光信号,40个循环。

## 用于检测花生DNA的特异性引物和探针及实时荧光定量PCR试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和体外诊断试剂技术领域,具体涉及用于检测花生DNA的特异性引物和探针以及实时荧光定量PCR试剂盒。

### 背景技术

[0002] 检测食用油DNA质量的基因主要有叶绿体ATP、RBCL基因和物种特异性基因。叶绿体是植物细胞重要的细胞器,叶绿体DNA被广泛用于系统进化的研究。叶绿体基因具有高度的保守型,而其中rbcL基因正是由于其进化特点而被广泛用于植物系统发生的研究。它的一些编码区在进化过程中速率较慢,比较保守,而一些非编码区在不同的物种间进化速度却比较快,具有一定的种间差异性和种内保守性,因而适合进行物种鉴别。通过对rbcL基因上一段序列进行通用引物设计,可以对不同的物种同时进行扩增,且同时具有种间差异性,在不同的物种之间差异比较大,易于进行物种鉴别。叶绿体基因在多数植物中以多拷贝形式存在,所以对于DNA含量甚微的精炼食用油,比单拷贝或少拷贝的物种特异性基因具有更高灵敏度的优势。物种特异性参照基因需要满足以下2个条件:该作物所有品种都存在该基因;其他生物没有或不存在扩增该基因的特异靶序列。通过建立物种特异性PCR方法来检测食品加工品中的该物种,逐渐成为食品质量检测的重要手段。

[0003] PCR检测鉴定技术通常以内参基因(内源参照基因)为靶标,内参基因是具有植物物种专一性且拷贝数恒定、不显示等位基因变化的保守DNA序列,可用于对基因组中某一目的基因进行定量分析。因为内参基因的拷贝数恒定,不会收到种植环境、栽培措施等因素的影响,所以对于该物种的所有栽培品种都能够以该基因作为靶标进行PCR检测,通过内参基因的拷贝数来计算待测样本的数量。

[0004] 实时荧光定量PCR(Fluorescence quantitative PCR)技术从常规PCR定性检测迈上量化的台阶,它相对常规PCR技术先进、操作简便、利用实时荧光定量PCR技术能够实现实时监测、绝对定量和快速检测的目的,同时具有具有灵敏度高、特异性好、操作便捷等优点,因此非常适合临床检测。

[0005] 实时荧光定量PCR技术有很多分支,其定量方式也不同,主要分为荧光染料嵌入技术、荧光探针技术和自身淬灭荧光技术等。荧光染料嵌入技术是利用SYBR green I嵌入DNA双链是荧光强度增加的特性,将荧光信号引入双链DNA,该方法特异性较差,结果常受到引物二聚体的存在的干扰而导致假阳性等问题,因此不适合用于食品快检。而荧光探针技术如Taqman技术、分子信标技术等因为其特异性比荧光染料嵌入技术和自身淬灭荧光技术要好,因此更适合食品检验使用。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于设计一组植物源性食用油花生的特异性引物和探针序列,建立一种能广泛应用于食品检验的快速、灵敏、特异性好的用荧光定量PCR检测方法。本发明采

用基因克隆技术,将花生的Arah1基因片段插入到载体pMD18-T中,获得含有花生Arah1 DNA基因片段的重组质粒,以此作为标准品。根据花生的Arah1 DNA的基因片段编码基因序列设计并合成一组特异性引物和探针,优化PCR反应条件,建立以实时荧光定量聚合酶链反应为平台的检测方法,并对所建立的方法进行评估。。

[0007] 针对目前市场上频繁出现的食用油掺假行为,本发明以常见的油料作物花生为研究对象,结合常规PCR、实时荧光PCR,研究建立油料作物花生和食用花生油的实时荧光探针PCR方法,旨在构建快速、简便、准确和高效的常见食用油掺假分子生物学鉴别技术体系,为食用油质量监管和控制提供科学手段。运用分子生物学技术对食用油进行掺假检测,首要前提是从油脂中提取出适合PCR扩增的DNA。由于精炼食用油生产需经过高温及高压等处理,其中的DNA降解为大小不一的碎片,且含量极低,这给DNA提取造成了很大困难。因而DNA提取技术成为食用油PCR检测技术的瓶颈,是食用油检测成功与否的关键所在。本发明采用分子生物学相关技术,开展食用油品种鉴别技术研究,将为食用油产品的质量安全管理提供科学手段,有利于国内食用油市场的规范、高端食用油进出口贸易的顺利进行和整个食用油行业的健康发展。

[0008] 通过对花生Arah1序列对比,并对其进行Blast对比及特异性分析,结果表明,本发明设计的引物序列为花生物种特异性序列。该花生特异性引物的扩增长度为278bp,而扩增片段大小和扩增基因组对PCR扩增精炼食用油DNA很重要。扩增片段越小,PCR扩增成功率越高,且GC含量高的DNA在加工工程中更稳定,内源基因比外源基因在加工过程中更稳定。所以PCR扩增食用油DNA应该选择片段小且GC含量高的基因组片段。

[0009] 本发明的第一个目的是提供用于检测花生DNA的特异性引物和探针,所述探针序列为:5'-AAGTCATCAGCAGCCACGGAA-3' ;

[0010] 所述特异性引物为下述序列或为下述序列的互补链序列:

[0011] 上游引物序列为5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3' ;

[0012] 下游引物序列为5'-TGTTCCCCACTCTTGTTCT-3' 。

[0013] 作为优选,探针中5'端标记的荧光报告基团为FAM、TET、JOE、HEX、VIC中的一种,3'端标记的荧光淬灭基团为TAMRA、DABCYL、BHQ中的一种。

[0014] 作为优选,所述上游引物和所述下游引物为向5'端和3'端方向延伸一至数个碱基或删减一至数个碱基得到的序列。

[0015] 本发明的第二个目的是提供一种用于检测花生DNA的实时荧光定量PCR试剂盒,所述实时荧光定量PCR试剂盒包括权利要求1-3任一项所述的特异性引物和探针。

[0016] 作为优选,在10 $\mu$ l PCR反应体系中,所述上游引物的用量为0.1 $\mu$ l,所述下游引物的用量为0.1 $\mu$ l,所述探针的用量为0.2 $\mu$ l。

[0017] 作为优选,所述实时荧光定量PCR试剂盒还包括系列浓度标准品和阳性对照;所述系列浓度标准品是将花生Arah1 rDNA基因与载体连接,转化至感受态细胞中诱导表达,提取重组质粒,将重组质粒定量后稀释,得到系列浓度标准品。

[0018] 作为优选,所述标准品的核苷酸序列为序列列表中序列1。

[0019] 本发明的第三个目的是提供上述的特异性引物和探针、实时荧光定量PCR试剂盒在如下任一中的应用:

[0020] (1) 定性或定量检测或辅助检测花生DNA;

- [0021] (2) 制备定性或定量检测或辅助检测花生DNA的产品；
- [0022] (3) 定性或定量检测或辅助检测植物油中是否含有花生油；
- [0023] (4) 制备定性或定量检测或辅助检测植物油中是否含有花生油的产品。
- [0024] 本发明的第四个目的是提供一种检测或辅助检测植物油中是否含有花生油的方法,分别以系列浓度标准品和待测样品DNA为模板,利用特异性引物和探针进行实时荧光定量PCR,绘制标准曲线,通过标准曲线和待测样品的Ct值判定结果。
- [0025] 作为优选,所述实时荧光定量PCR的反应条件为:94℃预变性2分钟,94℃15秒、60℃40s并收集荧光信号,40个循环。
- [0026] 本发明提供用于对花生油进行定性、定量检测的引物和探针,通过提取待检测样品中的DNA,再结合实时荧光定量PCR检测技术,可达到准确定量检测待测标本中花生油DNA含量的目的。本发明所提供的引物和探针可用于科研及食品检验中对花生油DNA进行定性、定量分析,有利于开展食用油品种鉴别技术研究,将为食用油产品的质量安全管理提供科学手段,有利于国内食用油市场的规范、高端食用油进出口贸易的顺利进行和整个食用油行业的健康发展。下面结合附图以及具体实施方案对本发明做更详细阐述。

### 附图说明

- [0027] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:
- [0028] 图1-图3为3对引物探针特异性BLAST比对结果。
- [0029] 图4为将该最优引物对利用普通PCR方法扩增不同模板后,扩增产物电泳结果。
- [0030] 图5为本发明引物和探针体系优化实验结果。
- [0031] 图6为本发明花生标准品的标准曲线。
- [0032] 图7为本发明灵敏度实验结果。
- [0033] 图8为本发明特异性实验结果。

### 具体实施方式

- [0034] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。所用引物、探针和所用序列测定工作均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和完成。
- [0035] 实施例1 Arah1基因标准品的制备,
- [0036] 要建立实时荧光定量PCR方法,首先必须制备方法所需的外部标准品,标准品应包含高度保守、特异的序列,要保证反应的高特异性。本发明采用花生Arah1 rDNA作为靶序列。本实施例主要采用PCR技术扩增花生种子Arah1 rDNA基因,利用基因重组技术将其连接到质粒载体pMD18-T中,构建出重组质粒pMD18-T-Arah1,并进行相应的PCR鉴定和测序鉴定,最后经定量作为待建立方法的标准品,为下一步的方法及评估奠定基础。
- [0037] 一、模板DNA的制备
- [0038] 1、提取花生种子基因组DNA,用作Arah1 rDNA基因PCR扩增的模板。采用上海生工生物技术有限公司生产的Ezup柱式植物基因组DNA抽提试剂盒来提取花生种子基因组DNA,具体提取方法如下:

[0039] 取适量的植物组织在研钵中加入液氮充分碾磨成细分。转移细分(植物新鲜组织100mg)到1.5ml离心管,不要解冻,加入550 $\mu$ l 65 $^{\circ}$ C预热Buffer P1和4 $\mu$ l RNaseA剧烈涡旋振荡混匀1分钟,室温放置10分钟。加入130 $\mu$ l的Buffer P2,充分混匀,12000rpm离心3分钟。小心吸取上清到一个分离柱A,注意不要吸到界面物质,12000rpm离心1分钟,收集下液。加入1.5倍体积的Buffer P3立刻轻柔涡旋,充分混匀。将上一步所得混合物加入一个吸附柱AC中,(吸附柱加入收集管中)12000rpm离心1分钟,倒掉收集管中的废液。加入700 $\mu$ l漂洗液WB,12000rpm离心1分钟,弃掉废液。加入500 $\mu$ l漂洗液WB,12000rpm离心1分钟,弃掉废液。将吸附柱AC放回空收集管中,13000rpm离心3-5分钟,尽量除去漂洗液,取出吸附柱AC,放入一个干净的离心管中,在吸附柱的中间部位加入50 $\mu$ l洗脱缓冲液EB,室温放置3-5分钟,12000rpm离心1分钟收集DNA,可以放-20 $^{\circ}$ C保存。

[0040] 二、Arah1 rDNA基因片段的PCR扩增

[0041] 1、引物的设计与合成

[0042] Arah1 rDNA基因是花生中的内参基因,内参基因是具有植物物种专一性且拷贝数恒定、不显示等位基因变化的保守DNA序列,可用于对基因组中某一目的基因进行定量分析。

[0043] 本发明通过对NCBI数据库中花生内源基因Arah1 rDNA全序列进行生物信息学比对分析,选取适合设计引物和探针的保守片段序列为靶目标,应用Primer Premier 5软件,设计了一组实时荧光定量PCR引物和探针。

[0044] 本发明设计的引物对如下:

[0045] 上游引物:Arah1 293F:5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3'

[0046] 下游引物:Arah1 570R:5'-TGTTCCCCACTCTTGTCT-3'

[0047] 2、PCR反应体系和反应条件

[0048] 以提取的花生DNA为模板,以上述特异引物Arah1 293F/Arah1 570R为扩增引物,采用下述体系和反应条件进行PCR扩增。PCR体系如下:

[0049]	10 $\times$ PCR bufer	5 $\mu$ l
	dNTP (2.5 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l
	引物 F (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
	引物 R (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
[0050]	模板	2 $\mu$ l
	Taq 酶 (5U)	1 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	38.5 $\mu$ l
	总体积	50 $\mu$ l。

[0051] 其中引物采用Arah1 293F/Arah1 570R, Taq酶采用杭州博日 (BSA09M2), PCR扩增仪为西安天隆PCR model MG96+。

[0052] 扩增程序/反应条件: 94℃预变性5min; 94℃30s、55℃30s、72℃1min, 35个循环; 72℃10min, 取3μL扩增产物进行1%琼脂糖电泳, 检测PCR产物大小, 然后采用AXYGEN公司生产的DNA凝胶回收试剂盒纯化回收剩余的PCR扩增产物。利用上述引物对所扩增的序列为:

[0053] 5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGATCCTCGAGGACACACTGGCACCACCAACCAACGTTCCCCTCCAGGGGAGCGGACACGTGGCCGCAACCCGAGACTACGATGATGACCGCCGTCAACCCCGAAGAGAGGAAGGAGGCCGATGGGACCAGCTGGACCGAGGGAGCGTGAAAGAGAAGAAGACTGGAGACAACCAAGAGAAGATTGGAGGCGACCAAGTCA TCAGCAGCCACGGAAAATAAGGCCCGAAGGAAGAGAAGGAGAACAAGAGTGGGGAACA-3'。

[0054] 三、重组质粒pMD18-T-Arah1 rDNA的构建和转化

[0055] 1、连接反应: 将上述纯化得到的PCR扩增产物与pMD18-T (大连宝生物公司) 进行连接, 采用如下连接体系进行配制:

pMD18-T vector	1 μL
[0056] 回收 DNA	2 μL
Solution1	5 μL
[0057] ddH <sub>2</sub> O	2 μL

总体积 10 μL。

[0058] 配制完成后置于16℃进行过夜连接反应。

[0059] 2、pMD18-T-Arah1质粒的转化以及PCR鉴定

[0060] ①从-70℃的超低温冰箱中取出冻存的DH5α感受态细胞, 置于冰盒上使其自然解冻;

[0061] ②取连接产物10μL加入50μL的DH5α感受态细胞中, 轻轻摇匀后置冰浴30分钟;

[0062] ③42℃水浴中热休克90秒, 热休克后立即置冰上冷却2min;

[0063] ④向1.5ml EP管中加入预冷的400ml的LB液体培养基 (不含氨苄青霉素) 混匀后, 37℃200转/分轻摇培养1h;

[0064] ⑤将上述培养液摇匀后取100μl涂布于含Amp的LB平板上, 正面向上放置30min, 待菌液完全被培养基吸收后, 倒置培养皿37℃恒温箱培养过夜;

[0065] ⑥次日观察, 从平板上挑取白色单克隆菌落稀释于50μL无菌水中, 吸取2μL作为PCR模板, 剩余的稀释菌液加入到20ml的LB培养基中进行扩摇;

[0066] ⑦用载体通用引物RV-M/M13-47扩增上述稀释菌液, PCR产物采用1%琼脂糖凝胶电泳, 通过检测PCR产物大小鉴定阳性转化子。

[0067] 引物RV-M/M13-47序列如下:

[0068] 引物RV-M: 5'-GAGCGGATAACAATTTACACAGG-3'

[0069] 引物M13-47: 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'。

[0070] PCR体系如下:

[0071] 10×PCR bufer	2.5 μL
---------------------	--------

	dNTP (2.5 μM)	0.5 μL
	引物 F (5 μM)	0.5 μL
	引物 R (5 μM)	0.5 μL
[0072]	模板	2 μL
	Taq 酶 (5U)	0.5 μL
	ddH <sub>2</sub> O	18.5 μL
	总体积	25 μL。

[0073] 扩增程序/反应条件:94℃预变性5min;94℃30s、55℃30s、72℃1min,35个循环;72℃10min。

[0074] 采用Axygen公司生产的质粒制备试剂盒提取阳性重组质粒pMD18-T-Arah1 rDNA,测定浓度和纯度,同时吸取一部分纯化质粒送至上海生物工程有限公司进行测序,确定插入片段的基因序列与目的序列一致。

[0075] 四、标准品的获取和定量

[0076] 1、取步骤三得到的含有重组质粒pMD18-T-Arah1 rDNA的大肠杆菌DH5α100μL接种于5mL的LB液体培养基,37℃200rpm过夜摇培;

[0077] 2、取1ml培养过夜的菌液接种于30ml LB液体培养基,200rpm增菌培养2-3小时,然后采用Axygen公司生产的质粒制备试剂盒提取质粒;

[0078] 3、利用超微量紫外可见分光光度计对提取的质粒进行测定,测定A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub>,根据A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>判断质粒的纯度,根据A<sub>260</sub>的吸光度值可计算出样品中质粒DNA的含量,即10D值相当于50μg/ml双链DNA。

[0079] 4、质粒pMD18-T-Arah1 rDNA浓度(拷贝数)计算

[0080] (1) 质粒的分子量=3109bp×660(每对碱基的平均分子量)

[0081] (2) 测得质粒浓度为321.45μg/μl。因在进行实时荧光定量PCR时,需要以“拷贝数”为单位,因此需要将单位转换成copies/ml。

[0082] 质粒copies/ml=阿伏伽德罗常数×质粒摩尔数

[0083] 其中阿伏伽德罗常数=6.02×10<sup>23</sup>copies/mol。

[0084] 因此提取的质粒浓度copies/ml=321.45μg/ml×10<sup>-9</sup>×6.02×10<sup>23</sup>copies/mol÷(3109bp×660g/bp·mol)

[0085] =9.43×10<sup>10</sup>copies/ml

[0086] 10μl质粒+84.3μl的无菌水就得到浓度为1.00×10<sup>10</sup>copies/ml的质粒,再将该质粒进行10倍比稀释就可得到一系列浓度的质粒,并于-20℃保存备用。

[0087] 实施例2实时荧光定量PCR试剂盒

[0088] 一、特异性引物和探针的设计与合成

[0089] 以上述选取的花生的Arah1 rDNA基因的保守片段为靶目标,应用Primer Premier 5软件,设计了一组实时荧光定量PCR引物和探针。

[0090] 在NCBI上下载花生油Arah1基因,通过Primer Premier 5和Becon Designer软件设计了多对Arah1基因引物和探针,并通过NCBI中的BLAST进行引物特异性验证认为其中有



三对引物特异性都很高,比对结果见图1-图3。

[0091] 图1-图3为3对引物探针特异性BLAST比对结果。

[0092] 将花生的每一对引物通过普通PCR进行引物特异性筛选,选用的模板为:花生,大豆,葵花,胡麻,油菜,玉米,芝麻,橄榄,核桃,土豆,以水为阴性,扩增条带跑胶,三对引物中有一对引物的PCR特异性最高,该引物对的核苷酸序列为:

[0093] 上游引物:5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3';

[0094] 下游引物:5'-TGTTCCCCACTCTTGTTCT-3'。

[0095] 图4为将该最优引物对利用普通PCR方法扩增不同模板后,扩增产物电泳结果。其中,从左到右依次为:mark,大豆,葵花,胡麻,油菜,玉米,芝麻,橄榄,核桃,花生,土豆,水。

[0096] 利用该引物和探针进行荧光定量PCR引物特异性筛选,实验结果是该引物探针确实能满足特异性要求。具体如下:

[0097] 作为本发明的核心,一组用于花生实时荧光PCR检测的引物和探针核苷酸序列以及扩增片段如下所述:

[0098] 上游引物:5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3';

[0099] 下游引物:5'-TGTTCCCCACTCTTGTTCT-3';

[0100] 探针:5'-AAGTCATCAGCAGCCACGGAA-3'

[0101] 探针中5'端标记的荧光报告基团为FAM、TET、JOE、HEX、VIC中的一种,3'端标记的荧光淬灭基团为TAMRA、DABCYL、BHQ中的一种。

[0102] 扩增的核苷酸序列为:

[0103] 5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGATCCTCGAGGACACACTGGCACCACCAACCAACGTTCCCCTCCAGGGGAGCGGACACGTGGCCGCCAACCCGGAGACTACGATGATGACCGCCGTCAACCCCGAAGAGAGGAAGGAGGCCGATGGGACCAGCTGGACCGAGGGAGCGTGAAAGAGAAGAAGACTGGAGACAACCAAGAGAAGATTGGAGGCGACCAAGTCA TCAGCAGCCACGGAAAATAAGGCCCGAAGGAAGAGAAGGAGAACAAGAGTGGGGGAACA-3'。

[0104] 二、待测样本的制备

[0105] 本发明使用冷冻干燥法提取植物油DNA,保证植物油DNA提取的纯度和浓度。

[0106] 因精炼油经过复杂的处理后杂质较少,因此精炼油中DNA提取的重点是如何有效的富集植物油中的微量DNA。冷冻干燥作为一个浓缩的过程,可以使DNA浓度提高到沉淀作用范围内,为后续的沉淀做准备,保证植物油DNA提取的纯度和浓度。具体处理方法如下:

[0107] 1. 样品前处理

[0108] 1) 取花生油20ml于50ml离心管中,加20ml无菌水,振荡30min;

[0109] 2) 5000r/min离心30min,小心将水相转移到培养皿中;

[0110] 3) 将培养皿放于-80℃冷冻过夜,然后将培养皿转至真空干燥机种至水分完全蒸发。

[0111] 2. 裂解与分离

[0112] 1) 加1-2ml CTAB提取缓冲液(1000ml水中溶解CTAB 20g,Tris 12.1114g,NaCl 81.1816g,Na<sub>2</sub>EDTA 7.4144g,高压灭菌)至培养皿中,65℃温浴10min;

[0113] 2) 用CTAB提取缓冲液小心仔细地反复冲洗培养皿,将缓冲液转移至1.5ml离心管中;

[0114] 3) 400μL/管,加1μL2.5%线性丙烯酰胺,1/10体积的3mol/l NaAc,1ml无水乙醇,

混匀,-20℃放置1h;

[0115] 4) 15000r/min离心10min去除上清,70%乙醇洗沉淀1次,晾干;

[0116] 5) 加100μL无菌水充分溶解沉淀,-20℃保存。

[0117] 三、实时荧光定量PCR条件优化

[0118] 以浓度为 $1.00 \times 10^6$ copies/ml的阳性质粒为模板,采用百泰克公司生产的 $2 \times$  real-timePCR Premixture (probe) 实时荧光定量PCR试剂盒进行实验,实验采用的实时荧光定量PCR仪为苏州百源基因技术有限公司生产的ASA-9600实时荧光定量PCR。

[0119] 反应体系采用10μl体系,其中引物和探针的量采用表1组合进行反应。

[0120] 表1

[0121]

	第一组 (c)	第二组 (b)	第三组 (a)	第四组 (f)	第五组 (e)	第六组 (d)
引物	0.1μL/0.1μL	0.2μL/0.2μL	0.1μL/0.1μL	0.2μL/0.2μL	0.3μL/0.3μL	0.1μL/0.1μL
探针	0.1μL	0.1μL	0.2μL	0.2μL	0.2μL	0.3μL

[0122] 反应条件:94℃预变性2分钟,94℃15秒、60℃40s并收集荧光信号,40个循环。结果参照图5,数据显示10μl体系时,引物(5μM)分别加入0.1μl和探针(5μM)加入0.2μl时,Ct值最小,荧光信号最强。

[0123] 图5为本发明引物和探针体系优化实验结果。其中,图中显示10μl体系时,a代表引物(5μM)加入0.1μl和探针(5μM)加入0.2μl;b代表引物(5μM)加入0.2μl和探针(5μM)加入0.1μl;c代表引物(5μM)加入0.1μl和探针(5μM)加入0.1μl;d代表引物(5μM)加入0.1μl和探针(5μM)加入0.3μl;e代表引物(5μM)加入0.3μl和探针(5μM)加入0.2μl;f代表引物(5μM)加入0.2μl和探针(5μM)加入0.2μl。四、实时荧光定量PCR试剂盒的建立

[0124] 1、实时荧光定量PCR试剂盒包括以下组分:

[0125]  $2 \times$  premix、终浓度为5μM的上游引物、终浓度为5μM的下游引物、终浓度为5μM的探针、实施例1制备的Arah1 rDNA基因系列浓度标准品(系列浓度标准品的系列浓度为: $1.00 \times 10^8$ copies/ml、 $1.00 \times 10^7$ copies/ml、 $1.00 \times 10^6$ copies/ml、 $1.00 \times 10^5$ copies/ml、 $1.00 \times 10^4$ copies/ml)、阳性对照(浓度为 $1.00 \times 10^7$ copies/ml的实施例1制备的重组质粒pMD18-T-Arah1 rDNA)和ddH<sub>2</sub>O,ddH<sub>2</sub>O作为试剂和阴性对照使用。

[0126] 上游引物:5'-ATCCTCGTTGTGTCTATGA-3';

[0127] 下游引物:5'-TGTTCCCCACTCTTGTCT-3';

[0128] 探针:5'-AAGTCATCAGCAGCCACGGAA-3'

[0129] 探针中5'端标记的荧光报告基团为FAM、TET、JOE、HEX、VIC中的一种,3'端标记的荧光淬灭基团为TAMRA、DABCYL、BHQ中的一种。

[0130] 2、应用实时荧光定量PCR试剂盒测定标准品的标准曲线

[0131] 以实施例1制备的Arah1 rDNA基因系列浓度标准品(系列浓度标准品的系列浓度为: $1.00 \times 10^8$ copies/ml、 $1.00 \times 10^7$ copies/ml、 $1.00 \times 10^6$ copies/ml、 $1.00 \times 10^5$ copies/ml、 $1.00 \times 10^4$ copies/ml)为模板,使用试剂盒中的引物和探针,进行荧光定量PCR扩增,同时设置阳性对照和阴性对照。

[0132] PCR反应体系如下:

2×premix 5 μl

Primer F (5 μM) 0.1 μl

Primer R (5 μM) 0.1 μl

[0133]

Probe (5 μM) 0.2 μl

模板 0.4 μl

ddH<sub>2</sub>O补至 10 μl。

[0134] 反应条件:94℃预变性2分钟,94℃15秒、60℃40s并收集荧光信号,40个循环。

[0135] 标准曲线的获得方法:以标准品的质粒浓度的对数为横坐标,以ct值为纵坐标得到标准曲线,结果参考图6。标准曲线原始方程为 $y = a + bx$ ,本次标准曲线的方程为 $Y = 39.57 - 3.04x$ 。

[0136] 图6为本发明花生标准品的标准曲线。由图6可知,标准品标准曲线光滑,相关系数高,具体为 $R^2 = 0.9976$ ,满足实时荧光定量PCR检测的要求。

[0137] 实施例3实时荧光定量PCR试剂盒对待测样品的定量检测方法

[0138] 分别以待测样品DNA和实施例1制备的Ara1 rDNA基因系列浓度标准品(系列浓度标准品的系列浓度为: $1.00 \times 10^8$ copies/ml、 $1.00 \times 10^7$ copies/ml、 $1.00 \times 10^6$ copies/ml、 $1.00 \times 10^5$ copies/ml、 $1.00 \times 10^4$ copies/ml)为模板,使用试剂盒中的引物和探针,进行荧光定量PCR扩增,同时设置阳性对照和阴性对照。

[0139] PCR反应体系如下:

2×premix 5 μl

Primer F (5 μM) 0.1 μl

Primer R (5 μM) 0.1 μl

[0140]

Probe (5 μM) 0.2 μl

模板 0.4 μl

ddH<sub>2</sub>O补至 10 μl。

[0141] 反应条件:94℃预变性2分钟,94℃15秒、60℃40s并收集荧光信号,40个循环。绘制标准曲线,通过标准曲线和待测样品的Ct值进行快速定量检测。

[0142] 实施例4实时荧光定量PCR试剂盒的性能实验

[0143] 1、灵敏度实验

[0144] 将上述制备得到的质粒进行10倍比稀释得到一系列浓度的质粒,选取浓度为 $1.00 \times 10^8$ copies/ml、 $1.00 \times 10^7$ copies/ml、 $1.00 \times 10^6$ copies/ml、 $1.00 \times 10^5$ copies/ml、 $1.00 \times 10^4$ copies/ml、 $1.00 \times 10^3$ copies/ml、 $1.00 \times 10^2$ copies/ml等作为梯度模板。反应体系如下:

	2×premix	5 μl
	Primer F (5 μM)	0.1 μl
	Primer R (5 μM)	0.1 μl
[0145]	Probe (5 μM)	0.2 μl
	模板	0.4 μl
	ddH <sub>2</sub> O补至	10 μl。

[0146] 反应条件:94℃预变性2分钟,94℃15秒、60℃40s并收集荧光信号,40个循环。根据仪器所检测到的荧光信号经软件处理获得荧光曲线,观察荧光曲线的信号,结果(见图7)显示当质粒浓度达到 $1.00 \times 10^3$ copies/ml时依然有荧光信号,而当质粒浓度达到 $1.00 \times 10^2$ copies/ml时没有荧光信号,因此该方法的灵敏度为 $1.00 \times 10^3$ copies/ml。

[0147] 图7为本发明灵敏度实验结果。其中a代表质粒浓度分别为 $1.00 \times 10^8$ copies/ml、b代表质粒浓度为 $1.00 \times 10^7$ copies/ml、c代表质粒浓度为 $1.00 \times 10^6$ copies/ml、d代表质粒浓度为 $1.00 \times 10^5$ copies/ml、e代表质粒浓度为 $1.00 \times 10^4$ copies/ml、f代表质粒浓度为 $1.00 \times 10^3$ copies/ml、g代表质粒浓度为 $1.00 \times 10^2$ copies/ml和阴性对照。

[0148] 2、特异性实验

[0149] 为了证实本发明对花生检测的特异性,我们选取了其他油料作物做特异性实验,选取的油料作物包括:花生、胡麻、玉米、大豆、土豆、芝麻、油菜、核桃、葵花、橄榄。

[0150] 其中花生、胡麻、玉米、大豆、土豆、芝麻、油菜、核桃、葵花、橄榄等采用北京百泰克新型快速植物组织基因组DNA提取试剂盒(DP3111)提取DNA。采用百泰克公司生产的2×real-time PCR Premixture (probe)实时荧光定量PCR试剂盒进行实验,反应体系如下:

	2×premix	5 μl
	Primer F (5 μM)	0.1 μl
	Primer R (5 μM)	0.1 μl
[0151]	Probe (5 μM)	0.2 μl
	模板	0.4 μl
	ddH <sub>2</sub> O补至	10 μl。

[0152] 引物和探针为实施例2中所述。

[0153] 反应条件:94℃预变性2分钟,94℃15秒、60℃40s并收集荧光信号,40个循环。根据仪器所检测到的荧光信号经软件处理获得荧光曲线,观察荧光曲线的信号,分析特异性。结果参考图8,具体结果为仅花生检测为阳性,其余油料作物均为阴性,表明本发明具有很好的特异性(ct值>36为阴性)。检测结果如表2。

[0154] 表2

	油料作物名称	Ct 值	判读结果
[0155]	花生	19.07	阳性
	胡麻	无	阴性
	玉米	无	阴性
	大豆	无	阴性
	土豆	无	阴性
	黑芝麻	无	阳性
	油菜	无	阴性
	核桃	无	阴性
	葵花	无	阴性
	橄榄	无	阴性
	空白对照	无	阴性

[0156] 图8为本发明特异性实验结果。其中模板分别为：花生、胡麻、玉米、大豆、土豆、芝麻、油菜、核桃、葵花、橄榄、阴性对照。

[0157] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

## 序列表

<110>	苏州百源基因技术有限公司	
<120>	用于检测花生DNA的特异性引物和探针及实时荧光定量PCR试剂盒	
<160>	1	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	278	
<212>	DNA	
<213>	花生过敏原蛋白Arahl (Allergenic protein Arahl gene)	
<400>	1	
	atcctcgttg tgtctatgat cctcgaggac aactggcac caccaaccaa cgttcccctc	60
	caggggagcg gacacgtgge cgccaaccg gagaactaga tgatgaccgc cgtcaacccc	120
	gaagagagga aggaggccga tggggaccag ctggaccgag ggagcgtgaa agagaagaag	180
	actggagaca accaagagaa gattggagge gaccaagtca tcagcagcca cggaaaataa	240
	ggcccgaagg aagagaagga gaacaagagt ggggaaca	278

Select All Items Selected 0

41 Alerts

Description	Max score	Total score	Query cover	E. value	Ident	Accupion
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	40.1	40.1	100%	0.21	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	40.1	40.1	100%	0.21	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	40.1	40.1	100%	0.21	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	40.1	40.1	100%	0.21	100%	08_010319111.1
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	38.2	38.2	96%	0.01	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	38.2	38.2	96%	0.01	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	38.2	38.2	96%	0.01	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	38.2	38.2	96%	0.01	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	38.2	38.2	96%	0.01	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	36.2	36.2	90%	0.2	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	36.2	36.2	90%	0.2	100%	08_010319111.1
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	36.2	36.2	90%	0.2	100%	08_010319111.1
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	36.2	36.2	90%	0.2	100%	08_010319111.1
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	34.2	34.2	86%	1.3	100%	08_010319111.1
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	34.2	34.2	86%	1.3	100%	08_010319111.1
PROTECTED: Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	34.2	34.2	86%	1.3	100%	08_010319111.1
Available resources identified in the system are not sufficient to support the requested operation.	34.2	34.2	86%	1.3	100%	08_010319111.1

图1

Select: All None Selected 0

1. Alignments

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">PREDICTED: Arachis foveata allele: Ara h 1, clone F41B (LOC107817541), mRNA</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">NM_016319314.1</a>
<a href="#">PREDICTED: Arachis duranensis allele: Ara h 1, clone F17 (see LOC107466999), mRNA</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">NM_016059399.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea gene for major allergen Ara h 1, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">AF446237.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea cDNA: Ara h 1, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">AF591851.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea major allergen Ara h 1 gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">AF432331.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea cDNA: Ara h 1, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">AF581850.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea cDNA: Ara h 1, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">AF581849.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea cDNA: Ara h 1, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">AF581852.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea (clone P17) Ara h 1 mRNA, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">L29553.1</a>
<a href="#">Arachis hypogaea (clone F41B) Ara h 1 mRNA, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.21	100%	<a href="#">L24403.1</a>

图2



Select: All None Selected

Alignments	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: <i>Arachis hypogaea</i> sleragen Arsh.1, clone P419.1.53187173411.mRNA</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">XM_016319314.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">PREDICTED: <i>Arachis duranensis</i> sleragen Arsh.1, clone P419.1.53187173411.mRNA</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">XM_016319353.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea culture L1241A.6 Arsh.1 sleragen Arsh.1 gene, complete cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">HM640249.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea gene for major sleragen Arsh.1, complete cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">AF446237.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea conarachin mRNA, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">AY561851.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea major sleragen Arsh.1 gene, complete cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">AF432231.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea conarachin mRNA, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">AY561851.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea conarachin mRNA, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">AY561843.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea conarachin gene, partial cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">AY561852.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea (clone P419) Arsh.1 mRNA, complete cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">L33663.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Arachis hypogaea (clone P419) Arsh.1 mRNA, complete cds</a>	38.2	38.2	100%	0.81	100%	<a href="#">L34462.1</a>

图3

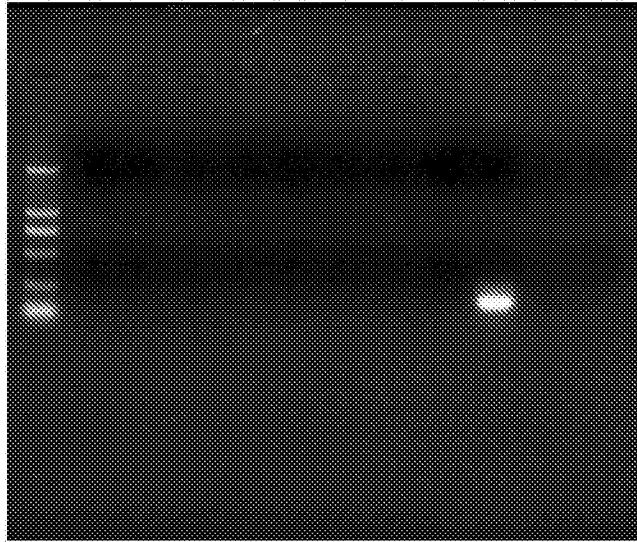


图4

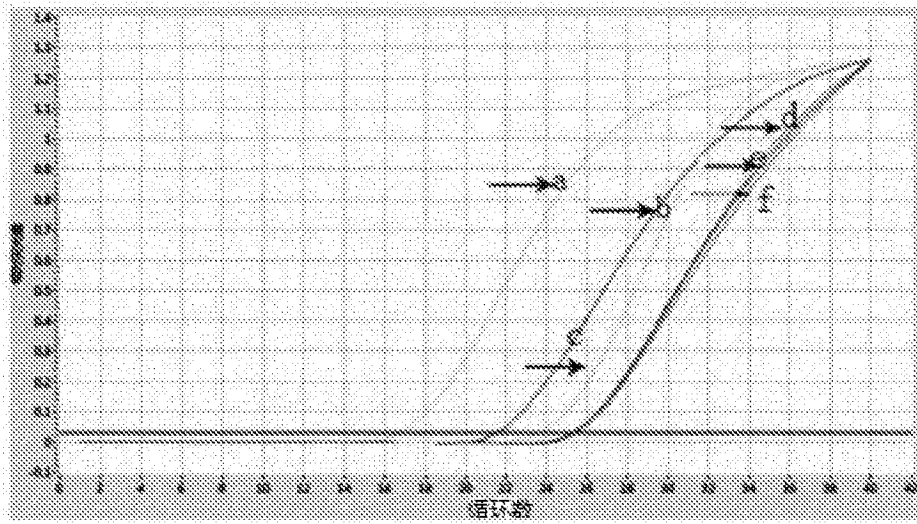


图5

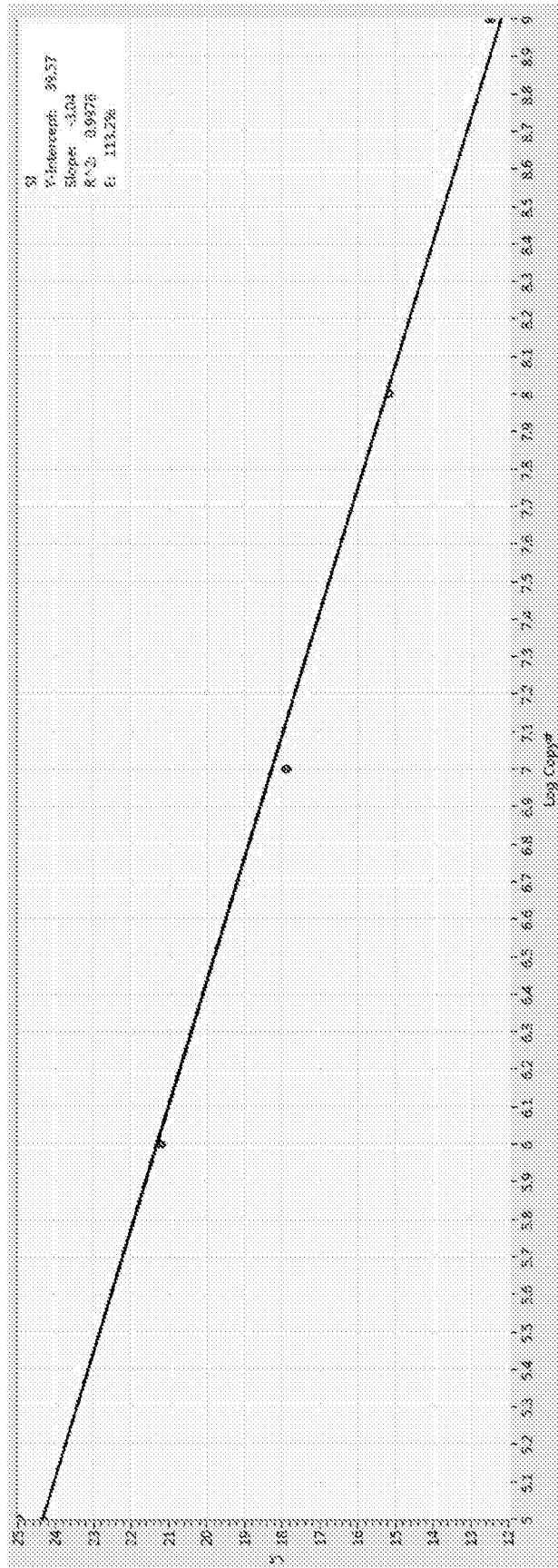


图6

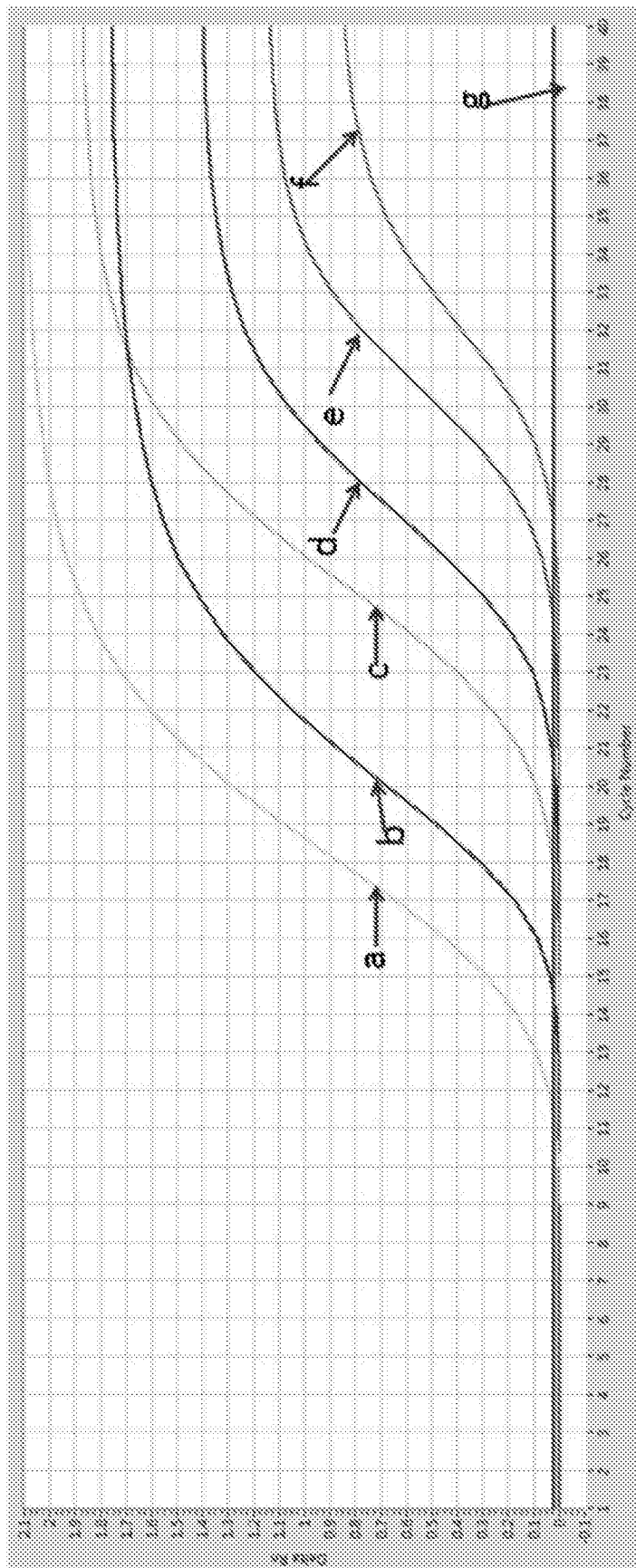


图7

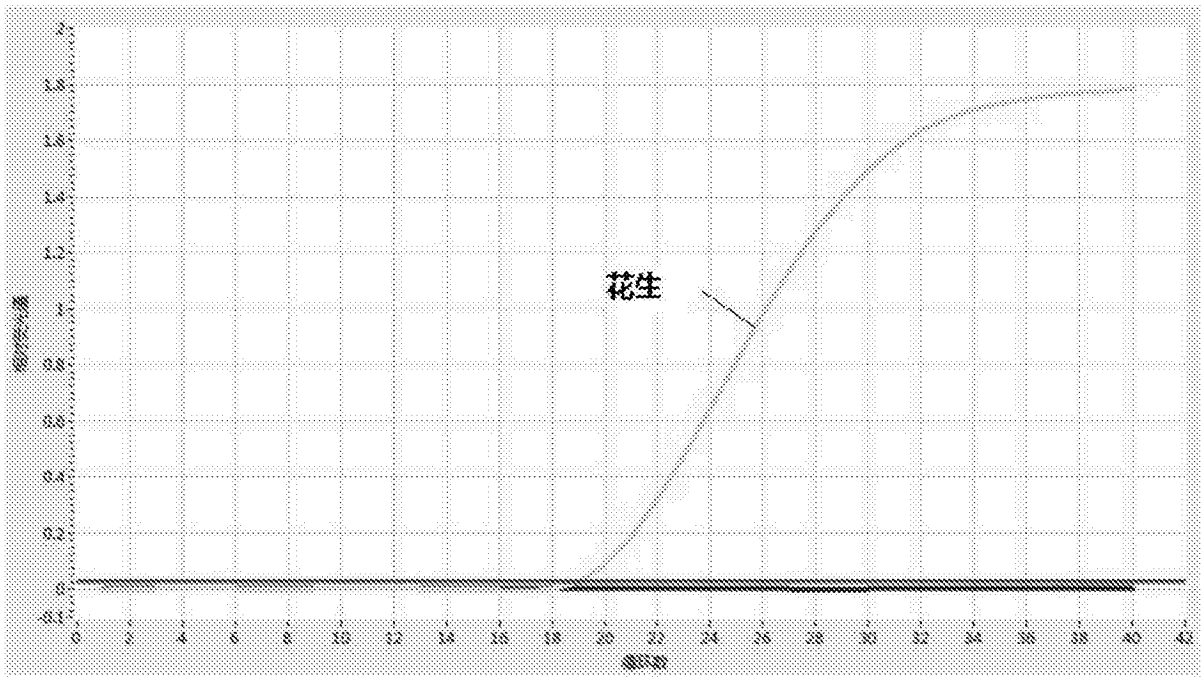


图8