



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105087558 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201510451305.9

C12Q 1/68(2006.01)

(22)申请日 2015.07.29

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 103642918 A, 2014.03.19, 实施例2, 3.

申请公布号 CN 105087558 A

CN 104232627 A, 2014.12.24, 说明书第12, 13页.

(43)申请公布日 2015.11.25

审查员 张起

(73)专利权人 黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所

地址 150086 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号

(72)发明人 温洪涛 关海涛 张瑞英

(74)专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理事务所(普通合伙) 11447

代理人 王浩然 周建秋

(51)Int. Cl.

权利要求书1页 说明书8页

C12N 15/11(2006.01)

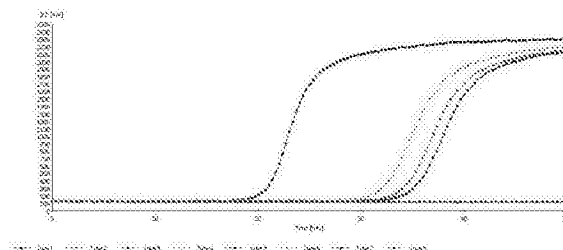
序列表5页 附图3页

(54)发明名称

转基因大豆的检测试剂盒和检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种引物组,该引物组包括外引物对、内引物对和环引物对;其中,所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物。本发明还提供了一种试剂盒,该试剂盒至少包括如上所示的引物组和环介导等温核酸扩增试剂。本发明还提供了一种检测转基因大豆MON87701的方法。通过上述技术方案,本发明能够通过环介导等温核酸扩增方法对转基因大豆MON87701实现快速、简便、灵敏且准确地检测。



1. 一种试剂盒,其特征在于,该试剂盒至少包括引物组和环介导等温核酸扩增试剂;

其中,所述引物组包括外引物对、内引物对和环引物对;所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述内引物对包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的引物;所述环引物对包括SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物;

其中,所述环介导等温核酸扩增试剂包括扩增缓冲液、dNTP和DNA聚合酶;

其中,所述扩增缓冲液含有8-12mM的KCl、8-12mM的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1-3mM的 MgSO_4 和0.05-0.2体积%的TritonX-100且pH值为8.6-9.0;

其中,所述环介导等温核酸扩增试剂还包括6-10mM的 MgSO_4 和4-8mM的甜菜碱;

其中,该试剂盒还含有显色试剂,所述显色试剂为荧光染料SYBR Green I;

其中,所述外引物对以8-12 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液的形式存在,所述内引物对以35-45 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液的形式存在,所述环引物对以18-22 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液形式存在。

2. 一种检测转基因大豆MON87701的方法,其特征在于,该方法至少包括如下步骤:(1)提取待测大豆的基因组DNA作为待扩增样本;(2)使用引物组,以所述待扩增样本为模板,进行环介导等温核酸扩增的操作;(3)在环介导等温核酸扩增的进行过程中通过实时荧光法检测是否具有S型扩增曲线;和/或,在环介导等温核酸扩增结束后,通过染色和/或电泳检测扩增后的物料中是否含有特异性扩增产物;如果在环介导等温核酸扩增的进行过程中具有S型扩增曲线,或,扩增后的物料中含有特异性扩增产物,则指示待测大豆为转基因大豆MON87701;

其中,所述引物组包括外引物对、内引物对和环引物对;所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述内引物对包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的引物;所述环引物对包括SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物;

相对于25 μL 的环介导等温核酸扩增反应体系,以基因组DNA的量计,待扩增样本的用量为25-50ng。

转基因大豆的检测试剂盒和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及农业生物技术领域,具体地,涉及检测转基因大豆的一种引物组、一种试剂盒和一种检测方法。

背景技术

[0002] 国际农业生物技术应用服务组织发表的《2014年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势》报告显示,全球转基因作物种植面积达到1.815亿公顷,比2013年增加了600万公顷,转基因作物经过19年的发展,种植面积增加了100倍以上,已成为现代农业史上采用最为迅速的作物技术。

[0003] 转基因大豆作为最重要的转基因作物之一,目前已有27个事件在26个国家中被批准用于食物、饲料、环境释放或者种植。其中美国国内94%的大豆都是转基因大豆,巴西的种植面积达到了91%。虽然我国还没有批准任何转基因大豆品系进行商业化种植,但我国已经成为转基因大豆的使用与消费大国,产品越来越多地进入了我国的生产与消费链,2013年转基因大豆的进口总量已达到6000万吨。

[0004] 为了加强对农业转基因生物的安全管理,保障人体健康,规范转基因产品的销售行为,引导和保护消费者的知情权,2002年中国农业部颁布了《农业转基因生物标识管理办法》,2006年通过了《中华人民共和国农产品质量安全法》,明确规定在中国境内销售列入标识的转基因生物及其产品,必须进行是否含有转基因成分的标识。因此,为保护我国消费者利益,解决贸易纠纷,必须建立一套快速、有效、准确的检测方法。

[0005] 近年来,孟山都公司的抗虫转基因大豆MON87701已陆续在美国、加拿大、日本、欧盟、墨西哥等国家批准用于商业化种植或食用。2013年,农业部批准发放了孟山都远东有限公司申请的抗虫大豆MON87701可进口用作加工原料的农业转基因生物安全证书。

[0006] 目前,国内外针对抗虫转基因大豆MON87701的检测方法主要集中在普通的定性及定量PCR方法,这些方法都需要高端的仪器设备和专业的操作人员。本领域目前还没有检测效果良好且操作简单、设备要求低的特异性检测转基因大豆MON87701的方法。

[0007] LAMP技术是2000年日本荣研化学株式会社发明的一种体外恒温核酸扩增方法,即所谓的环介导等温核酸扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification,简称LAMP)技术。因其具有快速简便、操作准确、容易普及、安全可靠等优点,可以大量扩增所需的靶序列。该方法只需要极少的试剂费用和一个水浴锅即可完成绝大多数PCR检测的过程,无论是实验室检验还是现场检验都可以准确快速灵敏的完成,是真正普及型的核酸检测方法。

[0008] 但是,目前用于LAMP检测转基因大豆MON87701的引物的敏感性和特异性仍然不高,无法满足实际检测的需要。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种用在环介导等温核酸扩增的引物组,该引物组具有较高的敏感性和特异性,能够满足实际检测的需要。

[0010] 为了实现上述目的,一方面,本发明提供了一种引物组,该引物组包括外引物对、内引物对和环引物对;其中,所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物。

[0011] 另一方面,本发明还提供了一种试剂盒,该试剂盒至少包括如上所示的引物组和环介导等温核酸扩增试剂。

[0012] 再一方面,本发明还提供了一种检测转基因大豆MON87701的方法,该方法至少包括如下步骤:(1)提取待测大豆的基因组DNA作为待扩增样本;(2)使用如上所述的引物组,以所述待扩增样本为模版,进行环介导等温核酸扩增的操作;(3)在环介导等温核酸扩增的进行过程中通过实时荧光法检测是否具有S型扩增曲线;和/或,在环介导等温核酸扩增结束后,通过染色和/或电泳检测扩增后的物料中是否含有特异性扩增产物;如果在环介导等温核酸扩增的进行过程中具有S型扩增曲线,或,扩增后的物料中含有特异性扩增产物,则指示待测大豆为转基因大豆MON87701。

[0013] 通过上述技术方案,本发明能够通过环介导等温核酸扩增方法对转基因大豆MON87701实现快速、简便、灵敏且准确地检测。

[0014] 本发明的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

[0015] 附图是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,与下面的具体实施方式一起用于解释本发明,但并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0016] 图1是实施例1中的4种引物组的扩增同一样本的扩增曲线。

[0017] 图2是实施例2中引物组1扩增不同大豆样本的实时扩增图。

[0018] 图3是实施例3中引物组1对不同转基因生物材料的实时扩增图。

[0019] 图4是实施例4中引物组1扩增不同大豆样本的染色结果图。

[0020] 图5是实施例5中引物组1扩增不同转基因生物材料的染色结果图。

[0021] 图6是实施例6中引物组1扩增不同大豆样本的电泳结果图。

[0022] 图7是实施例6中引物组1扩增不同转基因生物材料的电泳结果图。

具体实施方式

[0023] 以下结合附图对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0024] 一方面,本发明提供了一种引物组,该引物组包括外引物对、内引物对和环引物对;其中,所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示的引物;所述外引物对包括SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物。

[0025] 具体地,本发明的引物组如表1所示:

[0026] 表1

[0027]

引物对	引物编号	引物序列	序列表编号
外引物对	MON87701-F3	CCATATTGACCATCATACTCATTG	SEQ ID NO: 1
	MON87701-B3	TTTTTAAGCAACCTTCGCA	SEQ ID NO: 2
内引物对	MON87701-FIP	GAAGCTTGC'TTTCTAAATTAGT CCTCTGATCCATGTAGATTTCCC G	SEQ ID NO: 3
	MON87701-BIP	TTCAAGAAAGTGAAGGCACGCA GTGCACCTTGTGTGGTTAG	SEQ ID NO: 4
环引物对	MON87701-LF	CTTTTTGATGGCTTCATGTC	SEQ ID NO: 5
	MON87701-LB	AGTGTGAGACACGTGTTGAGC	SEQ ID NO: 6

[0028] 本发明中,如上所述的引物可以通过常规的DNA合成方法进行合成,可以通过商业订制的方式获得上述引物。

[0029] 另一方面,本发明还提供了一种试剂盒,该试剂盒至少包括如上所示的引物组和环介导等温核酸扩增试剂。

[0030] 其中,如上所述的试剂盒中,所述外引物对可以以8-12 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液的形式存在,所述内引物对可以以35-45 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液的形式存在,所述环引物对可以以18-22 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液形式存在。

[0031] 其中,所述环介导等温核酸扩增试剂可以为常规的进行环介导等温核酸扩增所需的试剂,所述环介导等温核酸扩增试剂可以包括扩增缓冲液、dNTP和DNA聚合酶。其中,所述dNTP是指dATP、dTTP、dCTP和dGTP的等量(摩尔)混合物。其中,所述DNA聚合酶可以为常规的能够进行环介导等温核酸扩增的DNA聚合酶,例如BstDNA大片段聚合酶等。

[0032] 其中,所述扩增缓冲液可以含有8-12mM的KCl、8-12mM的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1-3mM的 MgSO_4 和0.05-0.2体积%的TritonX-100;且所述扩增缓冲液的pH值可以为8.6-9.0,最优选为8.8。

[0033] 其中,优选地,所述环介导等温核酸扩增试剂还包括6-10mM的 MgSO_4 和4-8mM的甜菜碱。

[0034] 其中,为了方便以显色的方式展示在环介导等温核酸扩增结束后的物料中是否含有特异性扩增产物,该试剂盒还含有显色试剂,所述显色试剂可以为荧光染料SYBR Green I。

[0035] 再一方面,本发明还提供了一种检测转基因大豆MON87701的方法,该方法至少包括如下步骤:(1)提取待测大豆的基因组DNA作为待扩增样本;(2)使用如上所述的引物组,以所述待扩增样本为模版,进行环介导等温核酸扩增的操作;(3)在环介导等温核酸扩增的进行过程中通过实时荧光法检测是否具有S型扩增曲线;和/或,在环介导等温核酸扩增结束后,通过染色和/或电泳检测扩增后的物料中是否含有特异性扩增产物;如果在环介导等温核酸扩增的进行过程中具有S型扩增曲线,或,扩增后的物料中含有特异性扩增产物,则指示待测大豆为转基因大豆MON87701。

[0036] 其中,相对于25 μL 的环介导等温核酸扩增反应体系,以基因组DNA的量计,待扩增样本的用量可以为25-50ng。

[0037] 其中,特别优选地,本发明的环介导等温核酸扩增可以以如下反应体系进行:恒温基因扩增反应体系为25 μL ,其中包括:F3/B3各0.4 μM 、FIP/BIP各1.6 μM 、LF/BF各0.8 μM 、8mM

MgSO₄、1×ThermoPol缓冲液(包含:20mM Tris-HCl (pH 8.8, 25℃), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1体积% TritonX-100)、6mM甜菜碱、1.2mM dNTP、8U BstDNA大片段聚合酶, 模版DNA溶液2μL。实时荧光检测需加入终浓度为1×的SYBR Green I; 显色检测需在PCR管盖内壁加1000×的SYBR Green I溶液2μL, 最后用双蒸水补足至25μL。

[0038] 其中, 特别优选地, 本发明的检测方法可以按照如下方式中的至少一种进行结果判定: (1) 实时荧光法: 将反应管放置在ESE-Quant tube scanner中, 设置反应条件为: 63℃恒温反应60min, 并在80℃反应3min。反应结束后观察ESE-Quant tube scanner软件判断扩增结果, 如果出现“S”型曲线则为阳性, 无“S”型曲线则为阴性; (2) 显色法: 将扩增反应后的物料与PCR管盖上的荧光染料SYBR Green I摇动混匀, 肉眼观察反应结果, 若颜色变为绿色则说明反应结果为阳性, 若颜色仍为红色说明反应为结果阴性; (3) 电泳法: 将LAMP扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳图为典型的LAMP阶梯条状说明反应结果为阳性, 若无特异性条带为阴性。其中, 如上所说的阳性表示待测大豆为转基因大豆MON87701, 如上所说的阴性表示待测大豆不是转基因大豆MON87701。

[0039] 以下, 通过实施例进一步详细说明本发明:

[0040] 制备实施例1

[0041] 按照文献(赵丽娟等, 环介导等温扩增技术及其应用《实验动物与比较医学》, 2014年, 第2期)中的引物设计策略, 设计如表2所示的引物, 并通过宝生物公司进行定制合成。

[0042] 表2

[0043]

引物组	引物对	引物编号	引物序列	序列表编号
1	外引物对	MON87701-F3	CCATATTGACCATCATACTCATTG	SEQ ID NO: 1
		MON87701-B3	TTTTTAAGCAACCTTCGCA	SEQ ID NO: 2
	内引物对	MON87701-FIP	GAAGCTTGCTTTCCTAAATTAGTCCTCTGATCCATG TAGATTTCCCG	SEQ ID NO: 3

[0044]

		MON87701-BIP	TTCAAGAAAAGTGAAGGCACGCAGTGCACTTGTGTGGTTAG	SEQ ID NO: 4
	环引物对	MON87701-LF	CTTTTGTATGGCTTCATGTC	SEQ ID NO: 5
		MON87701-LB	AGTGTGAGACACGTGTTGAGC	SEQ ID NO: 6
2	外引物对	MON87701-F3	GGTAATTACTCTTCTTTTCTCC	SEQ ID NO: 7
		MON87701-B3	CTGAGTGCACTTGTGTGG	SEQ ID NO: 8
	内引物对	MON87701-FIP	ACTTTTGTATGGCTTCATGTCCGATATTGACCATCATACTCATTGC	SEQ ID NO: 9
		MON87701-BIP	CAAGCTAATTC AAGAAAAGTGAAGGCGTGAGTGGCAGTAATCGC	SEQ ID NO: 10
	环引物对	MON87701-LF	GGAAATCTACATGGATCA	SEQ ID NO: 11
		MON87701-LB	AGTGTGAGACACGTGTTGAG	SEQ ID NO: 12
3	外引物对	MON87701-F3	GCTGATCCATGTAGATTCC	SEQ ID NO: 13
		MON87701-B3	TCCTTCTTTTATAAGTGCGAATC	SEQ ID NO: 14
	内引物对	MON87701-FIP	GCCTTCACTTCTTGAATTAGCTTGCGGACATGAAGCCATCAA	SEQ ID NO: 15
		MON87701-BIP	CGTGTGAGCGCGATTACTGACTTAATTTTAAAGCAACCTTCG	SEQ ID NO: 16
	环引物对	MON87701-LF	CTTTCCTAAATTAGTCCTA	SEQ ID NO: 17
		MON87701-LB	AACCACACAAGTGCCTCAG	SEQ ID NO: 18
4	外引物对	MON87701-F3	AGCCATCAAAAAGTAGGACTA	SEQ ID NO: 19
		MON87701-B3	TTTTTTCCTTCATCTCTATCCTT	SEQ ID NO: 20
	内引物对	MON87701-FIP	GCTCAACACGTGTCTCACACTATTTAGGAAAGCAA GCTAATTC AAG	SEQ ID NO: 21
		MON87701-BIP	CGATTACTGCCACTACTAACCCTTTTATAAGTGCGAATCAACTT	SEQ ID NO: 22
	环引物对	MON87701-LF	AGCGTGCCCTTCACTTT	SEQ ID NO: 23
		MON87701-LB	GTGCACTCAGTGCGAAGGTT	SEQ ID NO: 24

[0045] 实施例1

[0046] 将非转基因大豆(品系为黑农60,购自黑龙江省农业科学院农药种子销售中心,以下相同)分别磨成干粉与转基因大豆MON87701(购自AOCs公司,以下相同)的种子,然后按照9:1的重量比混合,并且使用DNA提取试剂盒(购自康为世纪公司,以下相同)按其说明书操作,进行DNA的提取,获得DNA浓度为15ng/ μ L的模板样品。

[0047] 按照如下反应体系,进行环介导等温核酸扩增:体系为25 μ L,其中包括:F3/B3各0.4 μ M、FIP/BIP各1.6 μ M、LF/BF各0.8 μ M、8mM MgSO₄、1 \times ThermoPol缓冲液(包含:20mM Tris-HCl (pH 8.8, 25 $^{\circ}$ C), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1体积% TritonX-100)、6mM甜菜碱、1.2mM dNTP、8U BstDNA大片段聚合酶,模版DNA溶液2 μ L。然后加入1 \times 的SYBR Green I以进行实时定量荧光检测。其中,使用相同的模板样品,对引物组1-4进行分别测试,分别如图1中Tube1-4所示。将反应管放置在ESE-Quant tube scanner中,设置反应条件为:63 $^{\circ}$ C恒温反应60min,并在80 $^{\circ}$ C反应3min。反应结束后观察ESE-Quant tube scanner软件判断扩增结果。结果如图1所示。根据图1可见,引物组1能较早地出现S型曲线,而引物组2、3和4出现S型曲线的时间较晚,由此说明引物组1具有更高的灵敏性。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例对引物组1和2进行特异性检测。

[0050] 将非转基因大豆与转基因大豆MON87701的种子分别磨成干粉,然后分别按照0:1、9:1、19:1、99:1、995:5、999:1和1:0的重量比混合,并且使用DNA提取试剂盒按其说明书操作,进行DNA的提取,获得DNA浓度为15ng/ μ L的模板样品。

[0051] 按照如下反应体系,进行环介导等温核酸扩增:体系为25 μ L,其中包括:F3/B3各0.4 μ M、FIP/BIP各1.6 μ M、LF/BF各0.8 μ M、8mM MgSO₄、1 \times ThermoPol缓冲液(包含:20mM Tris-HCl (pH 8.8,25 $^{\circ}$ C),10mM KCl,10mM (NH₄)₂SO₄,2mM MgSO₄,0.1体积% TritonX-100)、6mM甜菜碱、1.2mM dNTP、8U BstDNA大片段聚合酶,模版DNA溶液2 μ L。然后加入终浓度为1 \times 的SYBR Green I以进行实时定量荧光检测。其中,使用不同的模板样品,对引物组1-2进行分别测试。将反应管放置在ESE-Quant tube scanner中,设置反应条件为:63 $^{\circ}$ C恒温反应60min,并在80 $^{\circ}$ C反应3min。反应结束后观察ESE-Quant tube scanner软件判断扩增结果。结果如图2所示,其中图2为引物组1的结果图,其中Tube1-7的模板分别为按照0:1、9:1、19:1、99:1、995:5、999:1和1:0的重量比混合的非转基因大豆与转基因大豆MON87701的种子粉。根据图2可见,引物组1能准确地区分不同含量的转基因大豆MON87701,由此说明引物组1具有高特异性。

[0052] 实施例3

[0053] 按照表3制备如下样品的DNA作为模板,DNA浓度为15ng/ μ L,并使用引物组1进行环介导等温核酸扩增。

[0054] 表3

[0055]

Tube	样品
1	转基因大豆 MON87701
2	转基因大豆 356043、305423、CV127、MON89788、A5547-127、A2704-12、GTS40-3-2 混合样品
3	转基因玉米 Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、59122、MIR604、MON88017、3272、MON87460 混合样品
4	转基因油菜 MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、Topas19/2 混合样品
5	转基因棉花 MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913 混合样品
6	转基因水稻科丰 6 号、科丰 8 号、克螟稻、M12、TT51 混合样品
7	非转基因大豆

[0056] 按照如下反应体系,进行环介导等温核酸扩增:体系为25 μ L,其中包括:F3/B3各0.4 μ M、FIP/BIP各1.6 μ M、LF/BF各0.8 μ M、8mM MgSO₄、1 \times ThermoPol缓冲液(包含:20mM Tris-HCl (pH 8.8,25 $^{\circ}$ C),10mM KCl,10mM (NH₄)₂SO₄,2mM MgSO₄,0.1体积% TritonX-100)、6mM甜菜碱、1.2mM dNTP、8U BstDNA大片段聚合酶,模版DNA溶液2 μ L。然后加入终浓度为1 \times 的SYBR Green I以进行实时定量荧光检测。将反应管放置在ESE-Quant tube scanner中,

设置反应条件为:63℃恒温反应60min,并在80℃反应3min。反应结束后观察ESE-Quant tube scanner软件判断扩增结果。结果如图3所示,可见只有Tube1取得了S型扩增曲线,而其它样品不具有S型扩增曲线。

[0057] 实施例4

[0058] 将非转基因大豆与转基因大豆MON87701的种子分别磨成干粉,然后分别按照0:1、9:1、19:1、99:1、995:5、999:1和1:0的重量比混合,并且使用DNA提取试剂盒按其说明书操作,进行DNA的提取,获得DNA浓度为15ng/μL的模板样品。其中,对不同的模板样品使用引物组1进行测试。

[0059] 按照如下反应体系,进行环介导等温核酸扩增:体系为25μL,其中包括:F3/B3各0.4μM、FIP/BIP各1.6μM、LF/BF各0.8μM、8mM MgSO₄、1×ThermoPol缓冲液(包含:20mM Tris-HCl (pH 8.8, 25℃), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1体积% TritonX-100)、6mM甜菜碱、1.2mM dNTP、8U BstDNA大片段聚合酶,模版DNA溶液2μL。将反应管放置在水浴锅中,63℃恒温反应60min后在PCR管盖内壁加1000×的SYBR Green I溶液2μL,最后用双蒸水补足至25μL。结果如图4所示,其中Tube1-7的模板分别为按照0:1、9:1、19:1、99:1、995:5、999:1和1:0的重量比混合的非转基因大豆与转基因大豆MON87701的种子粉。根据图4肉眼可见,引物组1能准确地区分不同含量的转基因大豆MON87701,转基因大豆MON87701的含量越多,反应管中的液体颜色越接近绿色,转基因大豆MON87701的含量越少,反应管中的液体颜色越接近红色。

[0060] 实施例5

[0061] 使用与实施例3相同的模板样品,并使用引物组1进行环介导等温核酸扩增。

[0062] 按照如下反应体系,进行环介导等温核酸扩增:体系为25μL,其中包括:F3/B3各0.4μM、FIP/BIP各1.6μM、LF/BF各0.8μM、8mM MgSO₄、1×ThermoPol缓冲液(包含:20mM Tris-HCl (pH 8.8, 25℃), 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1体积% TritonX-100)、6mM甜菜碱、1.2mM dNTP、8U BstDNA大片段聚合酶,模版DNA溶液2μL。将反应管放置在水浴锅中,63℃恒温反应60min后在PCR管盖内壁加1000×的SYBR Green I溶液2μL,最后用双蒸水补足至25μL。结果如图5所示,根据图5肉眼可见,只有转基因大豆MON87701 (Tube1) 为绿色,其它反应管中的液体颜色为红色。

[0063] 实施例6

[0064] 对实施例4和5得到的扩增后的物料进行电泳检测,结果分别如图6和图7所示。图6可见转基因大豆MON87701的含量越多,阶梯状电泳条带越深,转基因大豆MON87701的含量越少,阶梯状电泳条带越浅。图7可见只有转基因大豆MON87701 (Tube1) 具有阶梯状电泳条带,其它样本未出现阶梯状电泳条带。

[0065] 以上结合附图详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0066] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0067] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本

发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

SEQUENCE LISTING

	<110> 黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所	
	<120> 转基因大豆的检测试剂盒和检测方法	
	<130> 1972HNY	
	<160> 24	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 1	
	ccatattgac catcataetc attg	24
	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 2	
	ttttaagca accttcgca	19
[0001]	<210> 3	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 3	
	gaagcttgct ttctaaatt agtcctctga tccatgtaga tttcccg	47
	<210> 4	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 4	
	ttcaagaaag tgaaggcaag cagtcactt gtgtggttag	40
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 5	

	ctttttgatg gcttcatgtc	20
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 6	
	agtgtgagac acgtgttgag c	21
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 7	
	ggtaattact ctttcttttt ctcc	24
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
[0002]	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 8	
	ctgagtgcac ttgtgtgg	18
	<210> 9	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 9	
	actttttgat gcttcatgt ccgatattga ccataact cattgc	46
	<210> 10	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 10	
	caagctaatt caagaaagt aaggcgtgag tggcagtaat cgc	43
	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> DNA	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 11	
	ggaaatctac atggatca	18
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 12	
	agtgtagac acgtgttgag	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 13	
	gctgatecat gtagatttcc	20
[0003]	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 14	
	tccctctttt ataagtgcga atc	23
	<210> 15	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 15	
	gccctcactt tcttgaatta gcttgccgac atgaagccat caa	43
	<210> 16	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 16	
	cgtgttgagc gcgattaetg acttaatttt taageaacct tgc	43

	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 17	
	ctttcctaaa ttagtccta	19
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 18	
	aaccacacaa gtgcactcag	20
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
[0004]	<400> 19	
	agccatcaaa aagtaggact a	21
	<210> 20	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 20	
	ttttttcttt catctctatc ctt	23
	<210> 21	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> This sequence is synthesized in lab.	
	<400> 21	
	gctcaacacg tgtctcacac tatttaggaa agcaagctaa ttcaag	46
	<210> 22	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	

	<220>		
	<223>	This sequence is synthesized in lab.	
	<400>	22	
		cgattactgc cactcactaa cctttttata agtgcgaatc aactt	45
	<210>	23	
	<211>	16	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
[0005]	<223>	This sequence is synthesized in lab.	
	<400>	23	
		agcgtgcctt cacttt	16
	<210>	24	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	This sequence is synthesized in lab.	
	<400>	24	
		gtgcactcag tgcaaggtt	20

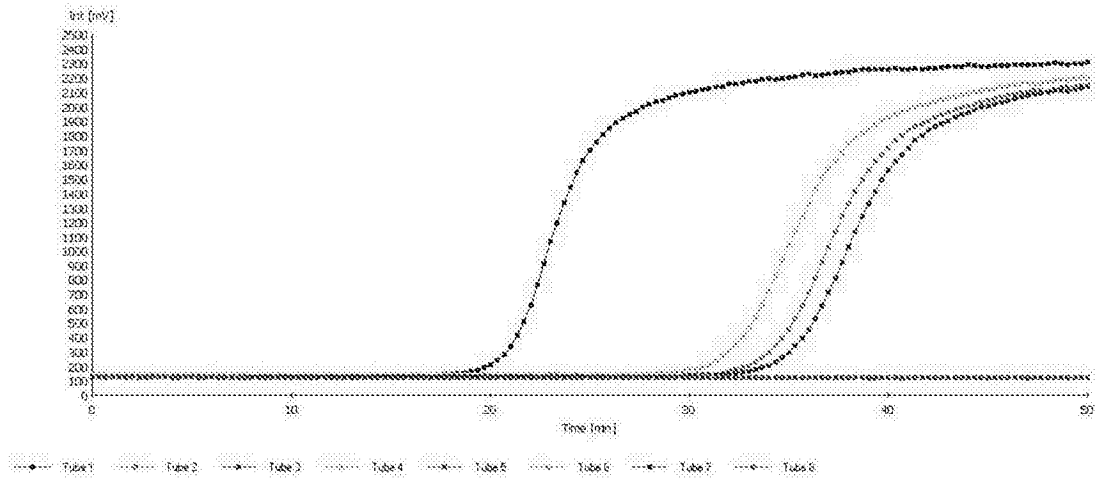


图1

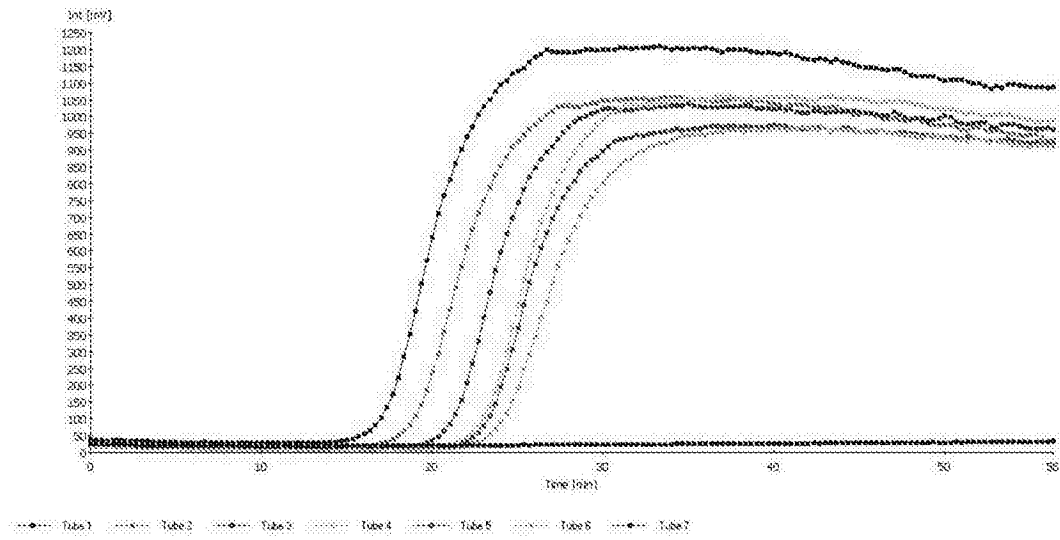


图2

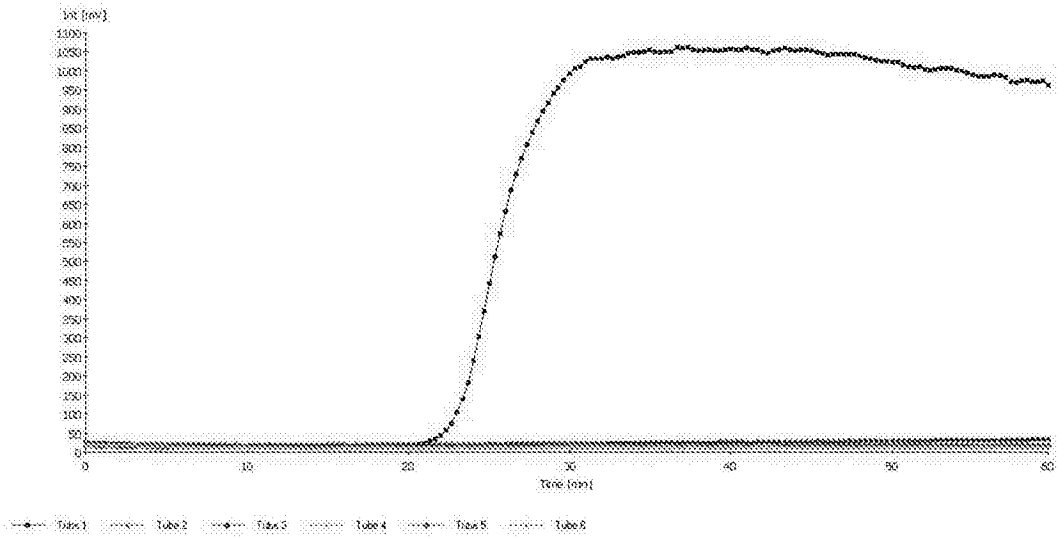


图3

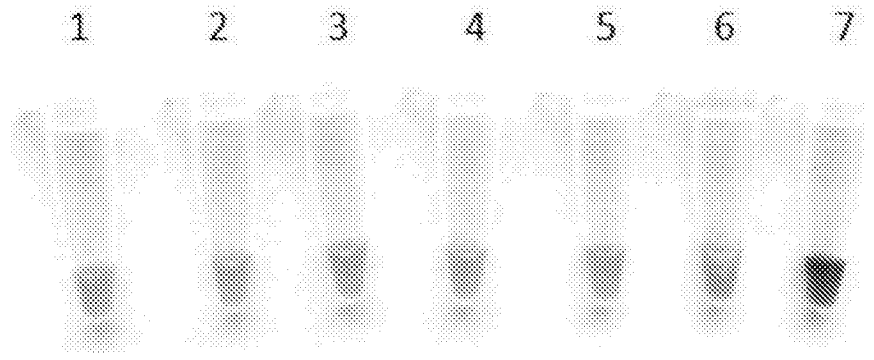


图4

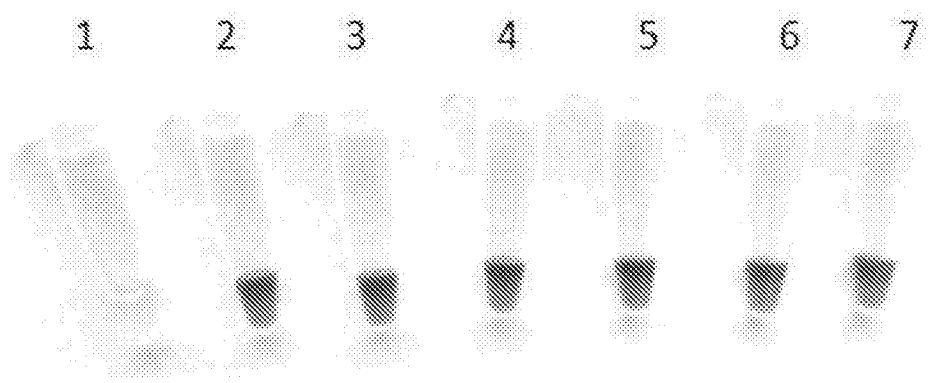


图5

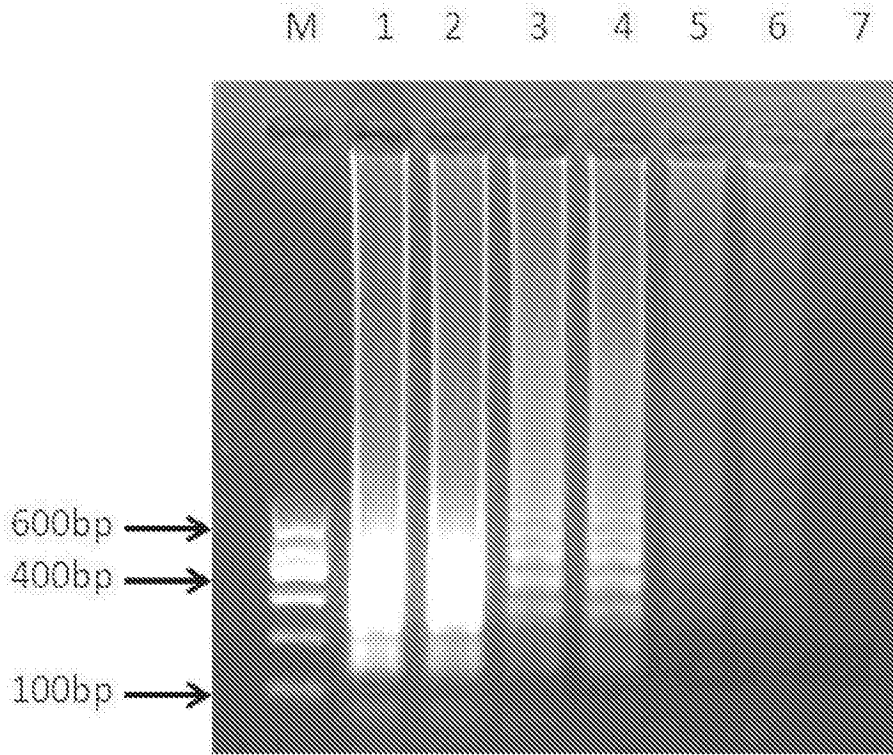


图6

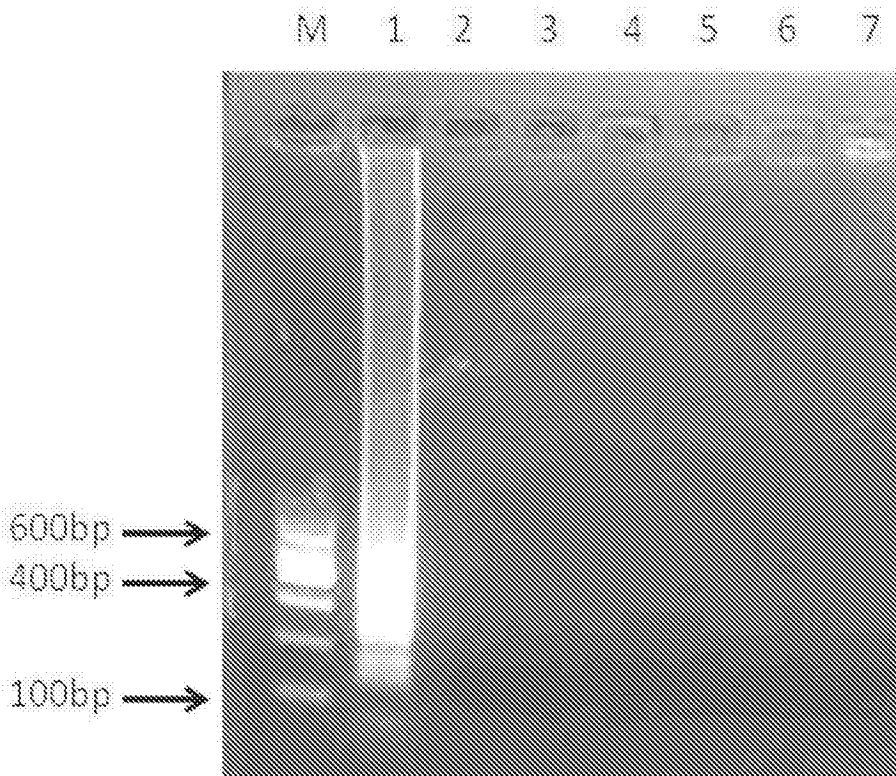


图7