



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112301146 A

(43) 申请公布日 2021.02.02

(21) 申请号 202011093157.5

(22) 申请日 2020.10.13

(71) 申请人 中国农业科学院生物技术研究所
地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72) 发明人 宛煜嵩 孟丽霞

(74) 专利代理机构 北京知汇林知识产权代理事
务所(普通合伙) 11794
代理人 董涛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

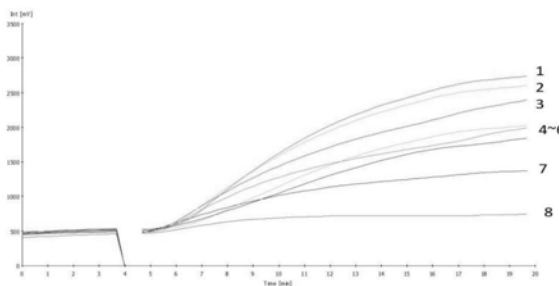
权利要求书1页 说明书7页
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称

转基因水稻B2A68-1的RPA检测引物与探针
组合、试剂盒及检测方法

(57) 摘要

一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测引物与
探针组合、试剂盒及检测方法,根据外源插入DNA
序列与水稻基因组的连接区域设计大量RPA引
物,从中筛选出一对可快速有效检测出转基因水
稻B2A68-1成分的引物及探针组合。以转基因水
稻B2A68-1基因组DNA为模板,利用该对引物和探
针进行RPA扩增及实时荧光检测,具有速度快、特
异性好、灵敏度高的特点。



1. 一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测引物与探针组合,所述引物包括正向引物和反向引物,其特征在于,所述正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述反向引物R的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

2. 一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1所述的引物和探针组合。

3. 一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测方法,其特征在于,包括如下步骤:以待测样品的基因组DNA为模板,利用权利要求1的引物和探针组合进行RPA扩增并进行荧光检测。

4. 根据权利要求3所述的转基因水稻B2A68-1的RPA检测方法,其特征在于,所述RPA扩增反应体系为每50 μ l反应体系中包括所述正向引物和反向引物各20 μ mol,探针5 μ mol,DNA模板50ng。

5. 根据权利要求4所述的转基因水稻B2A68-1的RPA检测方法,其特征在于,所述RPA扩增体系为总体积50 μ l,再水化缓冲液29.5 μ l,280 μ m M醋酸镁溶液2.5 μ l,余量为水。

6. 根据权利要求3-5任一项所述的转基因水稻B2A68-1的RPA检测方法,其特征在于,所述RPA扩增程序为39 $^{\circ}$ C反应20分钟。

7. 权利要求1所述的检测引物与探针组合、权利要求2所述的检测试剂盒和/或权利要求3-6任一项所述的检测方法在检测转基因水稻B2A68-1的种子资源中的应用。

转基因水稻B2A68-1的RPA检测引物与探针组合、试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本申请涉及分子生物学技术领域,具体而言,涉及一种转基因水稻 B2A68-1的RPA检测引物与探针组合、试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 转基因水稻B2A68-1是中国科学院亚热带农业生态研究所研发的抗虫且耐草铵膦除草剂的转基因水稻品系,是利用基因工程技术将来源于苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的cry2Aa基因、土壤细菌的bar基因导入水稻中而获得的抗螟虫和耐草铵膦除草剂转基因品系。该品系已进入转基因生物安全评价生产性试验阶段,具有广阔的产业化前景。在已报道的对转基因水稻B2A68-1检测方法中,主要是利用PCR仪在实验室中进行常规检测,但基于PCR的转基因检测方法需要PCR仪、凝胶成像系统等专业仪器设备,且扩增和产物检测时间较长(约3~4h),难以达到现场快速检测目的,因此,在实际工作中需要一种更加便捷、准确、且适用于现场操作的转基因检测新技术。

[0003] 重组酶聚合酶等温扩增技术(RPA),属于核酸等温扩增技术的一种。核酸等温扩增技术(isothermal nucleic acid amplification technology)是一种新型的扩增技术,恒定温度条件下即可进行反应,具有简便、快速、灵敏等优点,并可用于进行现场检验。RPA技术模拟了生物体内DNA的复制过程,重组酶蛋白在ATP参与下与单链DNA(引物)结合,形成DNA核蛋白微丝。该微丝牵扯周围的DNA分子,对模板DNA序列进行比对并搜索出与之匹配的序列,在单链结合蛋白的帮助下,双链模板DNA解链,引物和模板配对形成复制起始所需3'羟基末端,在DNA聚合酶的作用下开始复制延伸,并形成新的DNA。RPA荧光检测技术极大的缩短了反应时间。目前尚无利用RPA技术对转基因水稻B2A68-1进行品系特异性的鉴定方法。

发明内容

[0004] 本发明提供了一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测引物与探针组合,该引物包括正向引物和反向引物,正向引物的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,反向引物R的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,探针的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0005] 本发明还提供了一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测试剂盒,该试剂盒包括上述的引物和探针组合。

[0006] 本发明还提供了一种转基因水稻B2A68-1的RPA检测方法,该检测方法包括如下步骤:

[0007] 以待测样品的基因组DNA为模板,利用前述的引物和探针组合进行RPA扩增并进行荧光检测,如果得到明显的扩增曲线,则证明所检样品含有转基因水稻B2A68-1成分。

[0008] 进一步的,RPA扩增反应体系为每50 μ l反应体系中包括正向引物和反向引物各20pmol,探针5pmol,DNA模板50ng。

[0009] 进一步的,RPA扩增反应体系为每50 μ l反应体系中还包括(请在此处补充RPA扩增试剂盒中提供的成分),再水化缓冲液29.5 μ l,280 μ M醋酸镁溶液2.5 μ l,余量为水。

[0010] 进一步的,RPA扩增程序为39 $^{\circ}$ C反应20分钟

[0011] 本发明还提供一种前述的检测引物与探针组合、检测试剂盒和/或检测方法在检测转基因水稻B2A68-1的种子资源中的应用。

[0012] 本发明首次提供了转基因水稻B2A68-1品系特异性的RPA检测方法。本发明根据外源插入DNA序列与水稻基因组的连接区域设计大量RPA引物,从中筛选出一对可快速有效检测出转基因水稻B2A68-1成分的引物及探针组合。以转基因水稻B2A68-1为模板,利用该对引物和探针进行荧光检测,可以得到明显的扩增曲线。本发明的RPA检测引物与探针组合、试剂盒及检测方法具有速度快、特异性好、灵敏度高的特点。

附图说明

[0013] 图1为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F1与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F1与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F1与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F1与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F1与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F1与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F1与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F1与B2A68-1-R8;

[0014] 图2为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F2与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F2与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F2与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F2与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F2与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F2与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F2与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F2与B2A68-1-R8;

[0015] 图3为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F3与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F3与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F3与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F3与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F3与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F3与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F3与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F3与B2A68-1-R8;

[0016] 图4为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F4与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F4与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F4与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F4与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F4与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F4与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F4与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F4与B2A68-1-R8;

[0017] 图5为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F5与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F5与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F5与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F5与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F5与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F5与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F5与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F5与B2A68-1-R8;

[0018] 图6为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F6与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F6与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F6与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F6与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F6与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F6与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F6与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F6与B2A68-1-R8;

[0019] 图7为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F7与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F7与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F7与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F7与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F7与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F7与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F7与

B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F7与B2A68-1-R8;

[0020] 图8为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F8与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F8与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F8与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F8与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F8与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F8与B2A68-1-R6,8: B2A68-1-F8与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F8与B2A68-1-R8;

[0021] 图9为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F9与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F9与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F9与B2A68-1-R3,5:B2A68-1-F9与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F9与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F9与B2A68-1-R6,8:B2A68-1-F9与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F9与B2A68-1-R8;

[0022] 图10为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F10与B2A68-1-R1,3:B2A68-1-F10与B2A68-1-R2,4:B2A68-1-F10与B2A68-1-R3,5: B2A68-1-F10与B2A68-1-R4,6:B2A68-1-F10与B2A68-1-R5,7:B2A68-1-F10与 B2A68-1-R6,8:B2A68-1-F10与B2A68-1-R7,9:B2A68-1-F10与B2A68-1-R8;

[0023] 图11为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F1与B2A68-1-R9,3:B2A68-1-F2与B2A68-1-R9,4:B2A68-1-F3与B2A68-1-R9,5:B2A68-1-F4与B2A68-1-R9,6:B2A68-1-F5与B2A68-1-R9,7:B2A68-1-F6与B2A68-1-R9,8: B2A68-1-F7与B2A68-1-R9,9:B2A68-1-F8与B2A68-1-R9;

[0024] 图12为B2A68-1引物筛选Basic电泳图,其中,1:100bp Maker,2:B2A68-1-F1与B2A68-1-R10,3:B2A68-1-F2与B2A68-1-R10,4:B2A68-1-F3与B2A68-1-R10,5:B2A68-1-F4与B2A68-1-R10,6:B2A68-1-F5与B2A68-1-R10,7:B2A68-1-F6与 B2A68-1-R10,8:B2A68-1-F7与B2A68-1-R10,9:B2A68-1-F8与B2A68-1-R10;

[0025] 图13为B2A68-1引物筛选实时荧光检测图,其中,1:B2A68-1-F1与B2A68-1-R2, 2: B2A68-1-F1与B2A68-1-R4,3:B2A68-1-F1与B2A68-1-R3,4:B2A68-1-F1与 B2A68-1-R1,5: B2A68-1-F1与B2A68-1-R9,6:B2A68-1-F1与B2A68-1-R6,7:B2A68-1-F2与B2A68-1-R1,8: 空白对照;

[0026] 图14为B2A68-1引物筛选实时荧光检测图,其中,1:B2A68-1-F8与B2A68-1-R2, 2: B2A68-1-F2与B2A68-1-R2,3:B2A68-1-F2与B2A68-1-R4,4:B2A68-1-F2与 B2A68-1-R3,5: B2A68-1-F2与B2A68-1-R6,6:B2A68-1-F2与B2A68-1-R7,7:B2A68-1-F2与B2A68-1-R8,8: 空白对照;

[0027] 图15为B2A68-1引物筛选实时荧光检测图,其中,1:B2A68-1-F3与B2A68-1-R4, 2: B2A68-1-F3与B2A68-1-R6,3:B2A68-1-F3与B2A68-1-R3,4:B2A68-1-F3与 B2A68-1-R2,5: B2A68-1-F3与B2A68-1-R9,6:B2A68-1-F3与B2A68-1-R7,7:B2A68-1-F3与B2A68-1-R10,8: 空白对照;

[0028] 图16为B2A68-1引物筛选实时荧光检测图,其中,1:B2A68-1-F8与B2A68-1-R4, 2: B2A68-1-F8与B2A68-1-R2,3:B2A68-1-F8与B2A68-1-R3,4:B2A68-1-F8与 B2A68-1-R6,5: B2A68-1-F8与B2A68-1-R9,6:B2A68-1-F8与B2A68-1-R7,7:B2A68-1-F8与B2A68-1-R10,8: 空白对照;

[0029] 图17为引物B2A68-1-F1与B2A68-1-R2特异性检测图,其中,1:转基因水稻B2A68-1, 2:其他转基因水稻混合样,3:转基因玉米混合样,4:转基因大豆混合样,5:转基因棉花

混合样,6:转基因油菜混合样,7:转基因水稻B2A68-1受体,8:空白对照;

[0030] 图18为引物B2A68-1-F1与B2A68-1-R2特异性检测图,其中,1:转基因水稻B2A68-1, 2:非转基因水稻混合样,3:非转基因玉米混合样,4:非转基因大豆混合样,5:非转基因棉花混合样,6:非转基因油菜混合样,7:转基因水稻B2A68-1受体,8:空白对照;

[0031] 图19为引物B2A68-1-F8与B2A68-1-R4特异性检测图,其中,1:转基因水稻B2A68-1, 2:其他转基因水稻混合样,3:转基因玉米混合样,4:转基因大豆混合样,5:转基因棉花混合样,6:转基因油菜混合样,7:转基因水稻B2A68-1受体,8:空白对照;

[0032] 图20为引物B2A68-1-F8与B2A68-1-R4特异性检测图,其中,1:转基因水稻B2A68-1, 2:非转基因水稻混合样,3:非转基因玉米混合样,4:非转基因大豆混合样,5:非转基因棉花混合样,6:非转基因油菜混合样,7:转基因水稻B2A68-1受体,8:空白对照;

[0033] 图21为引物B2A68-1-F1与B2A68-1-R2灵敏度检测图,其中,样品1-8的DNA模板拷贝数依次为500;1000;5000;100;10000;100000;50;0。

[0034] 图22为引物B2A68-1-F8与B2A68-1-R4灵敏度检测图,其中,样品1-8的DNA模板拷贝数依次为10000;5000;100000;1000;500;100;50;0

具体实施方式

[0035] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0036] 实施例1、引物、探针组合的设计与筛选

[0037] 根据转基因水稻B2A68-1转化体特异性区域设计引物及探针。在设计引物时避免前后引物之间形成二级结构及引物间出现重复序列等问题,在探针的中后部选择两个T碱基,各标记一个荧光基团(FAM和BHQ1),在两个基团之间有一个脱碱基位点(THF),该位点在反应过程中被核酸外切酶识别并切割,使两个荧光基团分离产生荧光信号,特异性的探针可以实时监测荧光检测的结果。引物长度为35nt左右,RPA实验需要从靶标序列两端设计多对引物进行优化、筛选,个别碱基的增减或替换都会对实验结果产生重要影响。本发明中用于RPA方法扩增的靶标序列为水稻基因组与外源插入DNA的5'端部分序列。针对这一转化体特异性序列,本申请设计了RPA探针(编号为B2A68-1-P)并在探针上游与下游分别设计了10条正向引物(编号为B2A68-1-F1至B2A68-1-F10)、10条反向引物(编号为B2A68-1-R1至B2A68-1-R10)。筛选过程中,首先使用RPA-Basic试剂盒进行扩增并进行电泳,筛选能够扩增正确条带的引物对,具体电泳结果如图1-12所示。其中有28个引物对扩增条带较好,运用RPA-EX0试剂盒进行特异性实时荧光筛选,结果如图13-16所示,其中其中图13中1号线及图16中1号线起飞时间以及扩增效果较好,其引物对与Basic实验图1中3孔道及图8中5孔道引物对一致。因此,本申请初步筛选引物对B2A68-1-F1+B2A68-1-R2与B2A68-1-F8+B2A68-1-R4用于转基因水稻B2A68-1的品系特异性检测。其中B2A68-1-F1+B2A68-1-R2引物和探针组合序列见表1。

[0038] 表1

引物	序列
B2A68-1 -F1 (SEQ ID NO.1)	5'- TGTTACTAGCTGTGTGTCTCCTCTCATGGATATTA-3'
[0039] B2A68-1 -R2 (SEQ ID NO.2)	5'-TCGGCGTTAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCA A-3'
B2A68-1 -P (SEQ ID NO.3)	AACCGGTAAAGTAAATTCAGACGAT(FAMdT)GT(T HF)GAT(BHQ1dT)GAGAAGTGAATTTGA(3'block)

[0040] 注:FAM:发光基团;THF:脱碱基位点;BHQ1:淬灭基团;block:封闭基团,本次使用的碳酸化

[0041] 实施例2、利用实施例1筛选的引物及探针组合对转基因水稻B2A68-1检测的特异性、灵敏性分析

[0042] 1.实验材料

[0043] 1.1植物材料

[0044] 转基因水稻B2A68-1,转基因水稻B2A68-1受体材料,其他转基因水稻混合样,转基因玉米混合样,转基因大豆混合样,转基因棉花混合样,转基因油菜混合样,非转基因水稻混合样,非转基因玉米混合样,非转基因大豆混合样,非转基因棉花混合样,非转基因油菜混合样。

[0045] 1.2酶与试剂

[0046] 分子生物学试剂, TwistAmp DNA amplification Exo Kits购自TwistDX公司, TwistAmp DNA amplification Basic Kits购自TwistDX公司,其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。引物和探针选择实施例1中筛选得到的两组引物和探针,由北京生工生物技术有限公司合成。

[0047] 1.3实验仪器

[0048] DNA处理仪器:低温混合球磨仪MM400 (Retsch)

[0049] 荧光检测仪:RPA扩增检测仪(Twista)

[0050] 其它仪器包括:恒温水浴锅、电子天平、离心机、纯水仪等。

[0051] 2.实验方法和过程

[0052] 2.1基因组DNA的提取

[0053] 依照TianGen Plant Genomic DNA Kit试剂盒的操作手册,进行植物材料 DNA的提取。具体步骤如下:

- [0054] (1).取充分碾磨的植物材料种子粉末150mg,加入800 μ l 65 $^{\circ}$ C预热的缓冲液GP1,65 $^{\circ}$ C水浴60min,期间颠倒离心管数次以混合样品。
- [0055] (2).加入1:1的酚/氯仿进行抽提,12000rpm离心10min。
- [0056] (3).取上清加入800 μ l氯仿充分混匀,12000rpm离心10min。
- [0057] (4).取上清加入800 μ l缓冲液GP2,充分混匀。
- [0058] (5).将混匀的液体转入吸附柱CB3中,12000rpm离心30sec,弃废液
- [0059] (6).向吸附柱中加入600 μ l缓冲液GD,12000rpm离心30sec,弃废液
- [0060] (7).向吸附柱中加入800 μ l漂洗液PW,12000rpm离心30sec,弃废液
- [0061] (8).向吸附柱中加入600 μ l漂洗液PW,12000rpm离心30sec,弃废液
- [0062] (9).将吸附柱CB3放入收集管,12000rpm空转3min,弃废液,室温放置 10分钟
- [0063] (10).将吸附柱CB3转入干净收集管,滴加50 μ l水,室温放置10min,12000rpm 收集到离心管中。

[0064] 2.2DNA浓度和纯度测定

[0065] 使用NanoDrop 1000分光光度计(Thermo Scientific)测定DNA的纯度和浓度,并用去离子双蒸水调节DNA浓度至25ng/ μ l。

[0066] 2.3RPA反应体系

[0067] 经试验得到优化的RPA扩增体系,总体系50 μ l,(请在此处补充RPA扩增试剂盒中提供的成分)再水化缓冲液(Rehydration Buffer)29.5 μ l,280 μ m 醋酸镁溶液(Magnesium Actate)2.5 μ l,引物各2.4 μ l(10uM),植物材料DNA 2 μ l(25ng/ μ l),剩余用水补足。

[0068] 优化的RPA扩增程序:RPA扩增检测仪39 $^{\circ}$ C反应30分钟。

[0069] 2.4特异性检测

[0070] 将待检测材料转基因水稻B2A68-1,转基因水稻B2A68-1受体材料,其他转基因水稻混合样,转基因玉米混合样,转基因大豆混合样,转基因棉花混合样,转基因油菜混合样,非转基因水稻混合样,非转基因玉米混合样,非转基因大豆混合样,非转基因棉花混合样,非转基因油菜混合样的DNA样品按步骤2.3的反应体系进行RPA-EXO实验,测试特异性。

[0071] 2.5灵敏度检测

[0072] 将B2A68-1基因组DNA分别稀释如下的拷贝数:100000,10000,5000, 1000,500,100,50。按照步骤2.3的反应体系进行RPA-EXO实验测试灵敏度,同时进行阴性对照。

[0073] 3.实验结果

[0074] 特异性检测结果如图17-20所示,以转基因水稻B2A68-1为模板可以得到明显的扩增曲线,以其他转基因水稻混合样,转基因玉米混合样,转基因大豆混合样,转基因棉花混合样,转基因油菜混合样,非转基因水稻混合样,非转基因玉米混合样,非转基因大豆混合样,非转基因棉花混合样,非转基因油菜混合样的基因组DNA为模板均没有产生扩增曲线。

[0075] 灵敏度检测结果如图21-22所示,如图21所示,采用 B2A68-1-F1+B2A68-1-R2时,在阴性材料没有起飞的前提下,模板DNA拷贝数为100000,10000,5000,1000,500,100,50个拷贝时都有扩增曲线,说明该引物和探针组合以及检测方法鉴定转基因水稻B2A68-1的灵敏度可以达到50个拷贝。如图22所示,采用B2A68-1-F8与B2A68-1-R4时,在阴性材料没有起飞的前提下,模板DNA拷贝数为100000,10000,5000,1000,500个拷贝时有扩增曲线,模板DNA拷贝数为100,50个拷贝时则没有扩增曲线,说明该引物和探针组合以及检测方法鉴定

转基因水稻B2A68-1的灵敏度较差。因此,本发明最终选择B2A68-1-F1+B2A68-1-R2用作转基因水稻B2A68-1品系特异性的检测引物组合。

[0076] 如图17-18,20所示,扩增曲线在第10分钟左右即可超过阈值起飞,由此可以得出,采用本发明的引物和方法可以快速鉴定转基因水稻B2A68-1,鉴定时间仅需10分钟左右。

序列表

<110> 中国农业科学院生物技术研究所

<120> 转基因水稻B2A68-1的RPA检测引物与探针组合、试剂盒及检测方法

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

tgttactagc tgtgtgtctc ctctcatgga tatta 35

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

tcggcgtaa ttcagtacat taaaaacgtc cgcaa 35

<210> 3

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

aaccggtaa gtaaattcca gacgatgtga tgagaagtga atttga 46

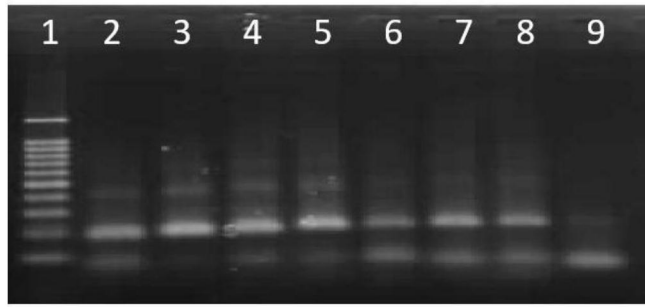


图1

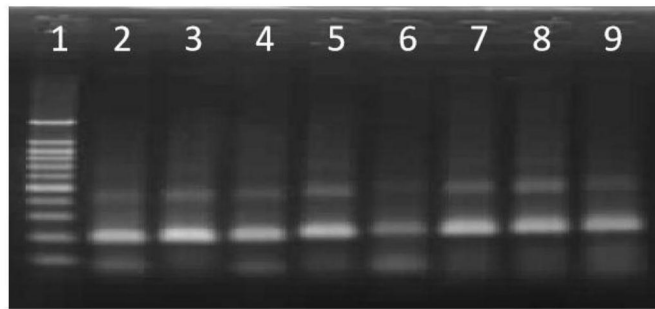


图2

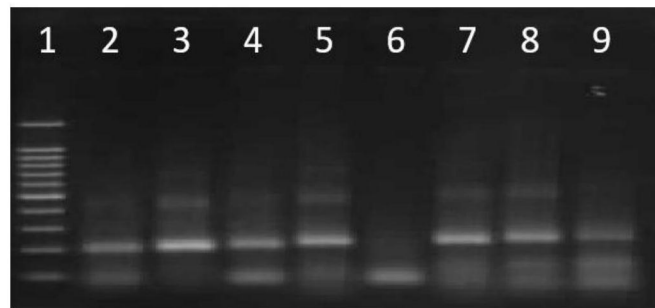


图3

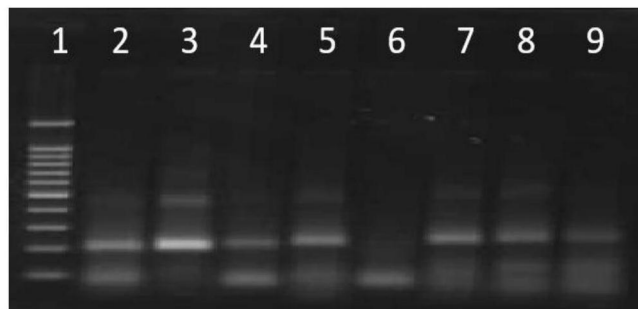


图4

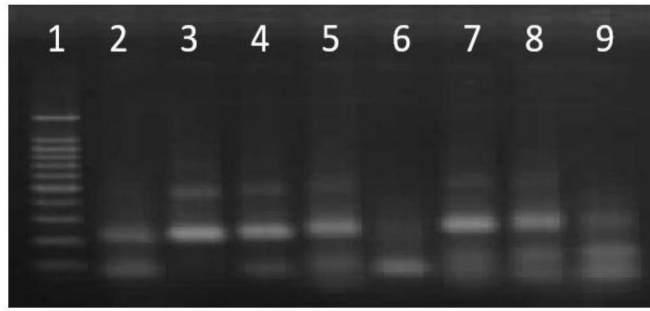


图5

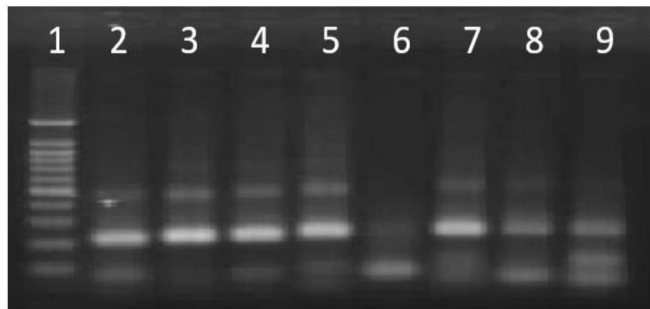


图6

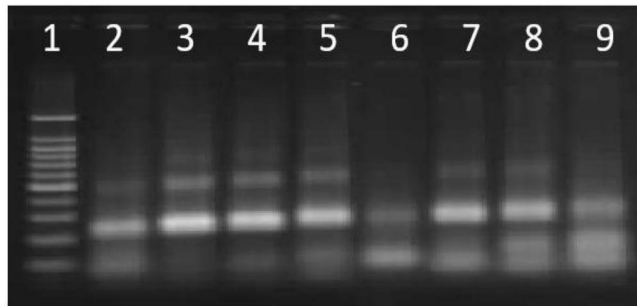


图7

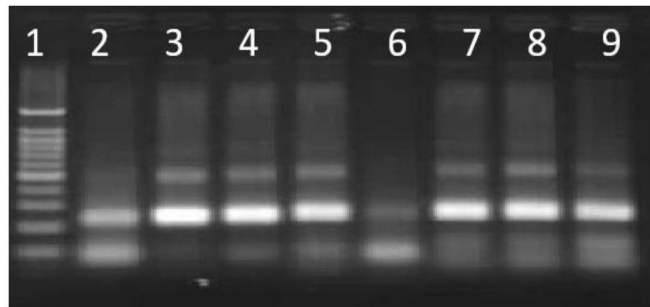


图8

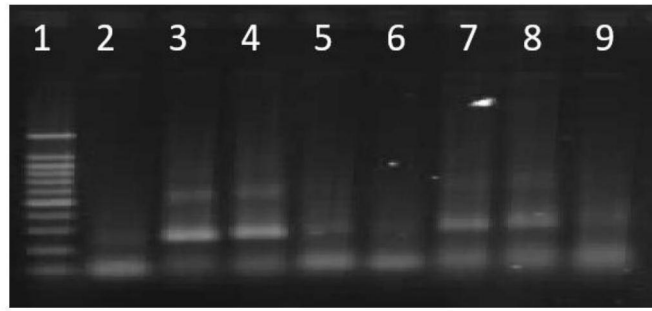


图9

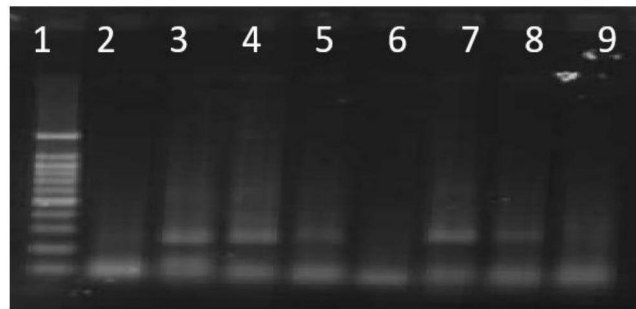


图10

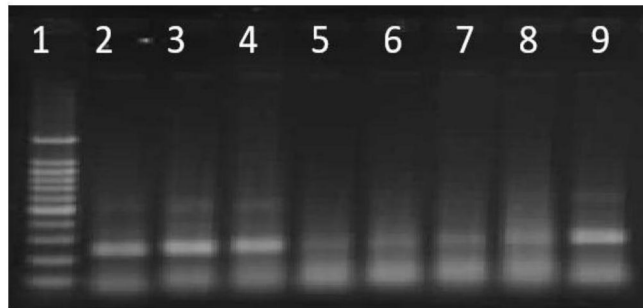


图11

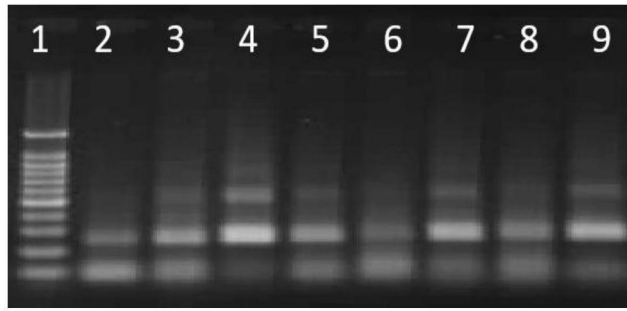


图12

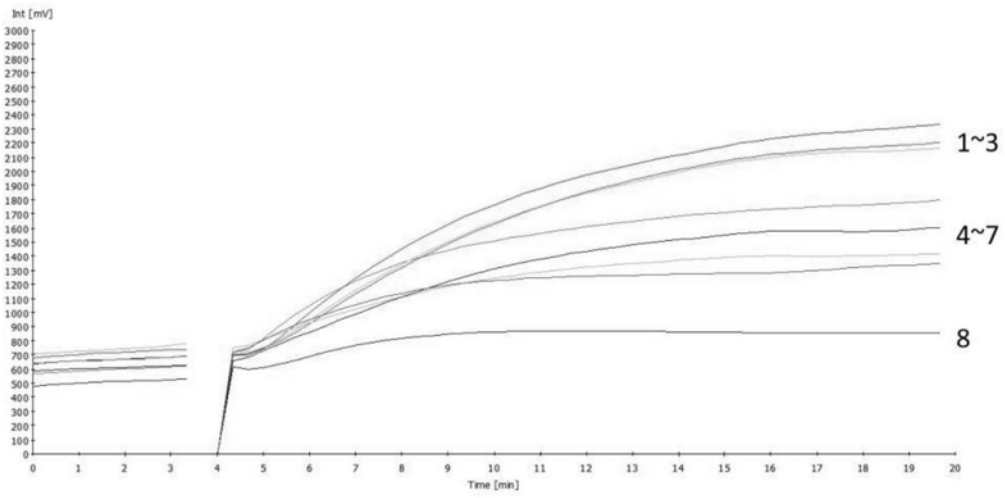


图13

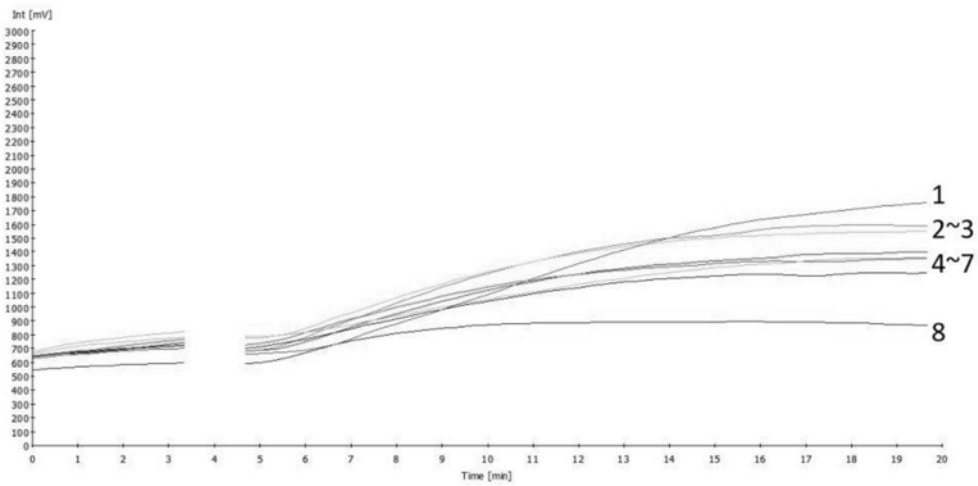


图14

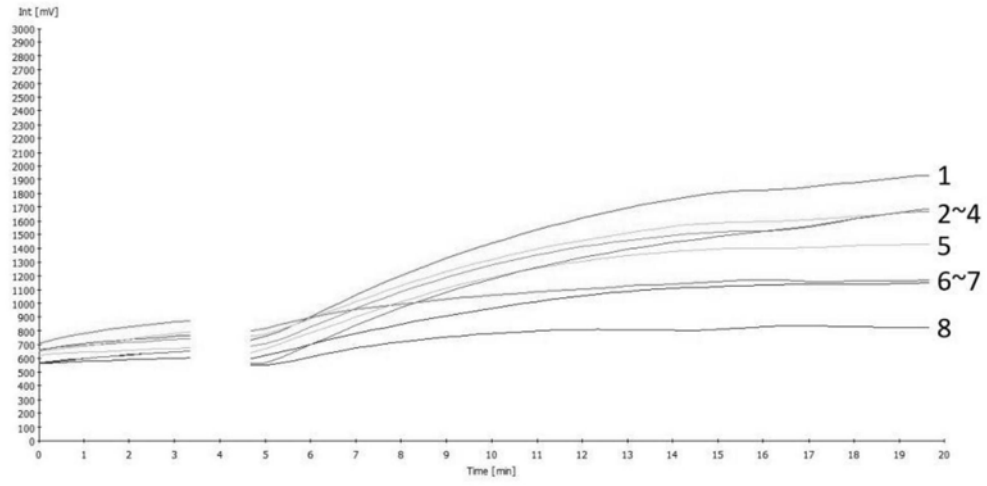


图15

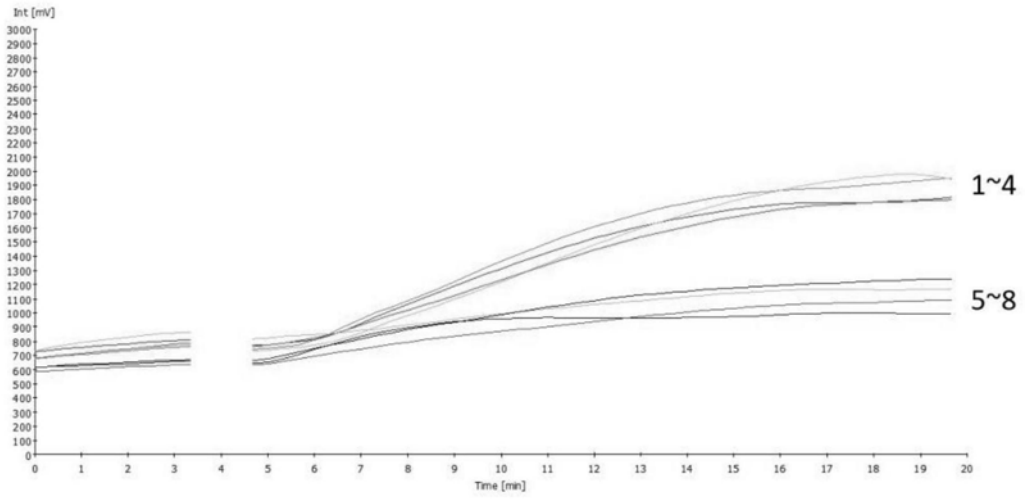


图16

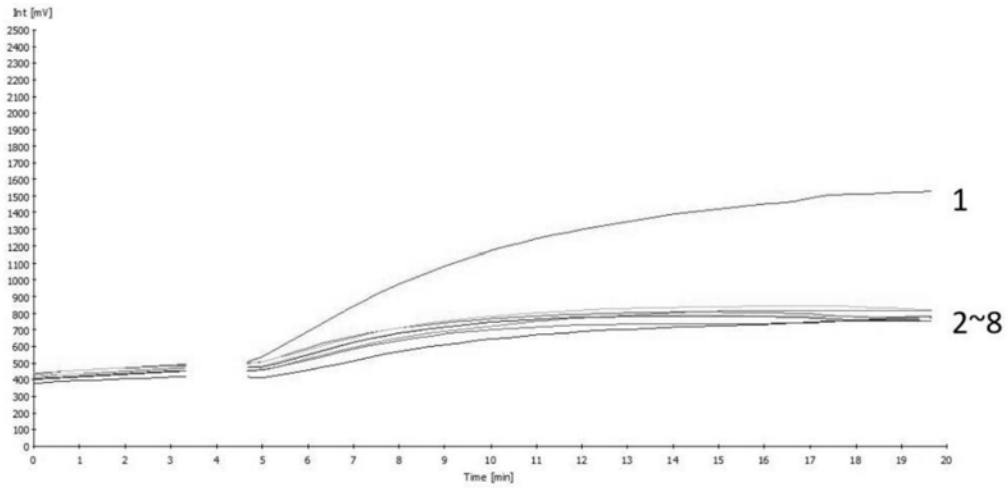


图17

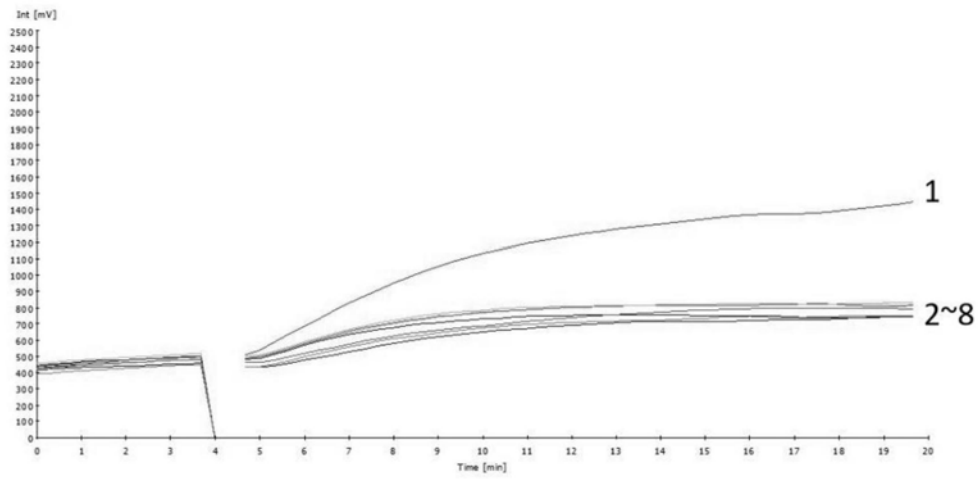


图18

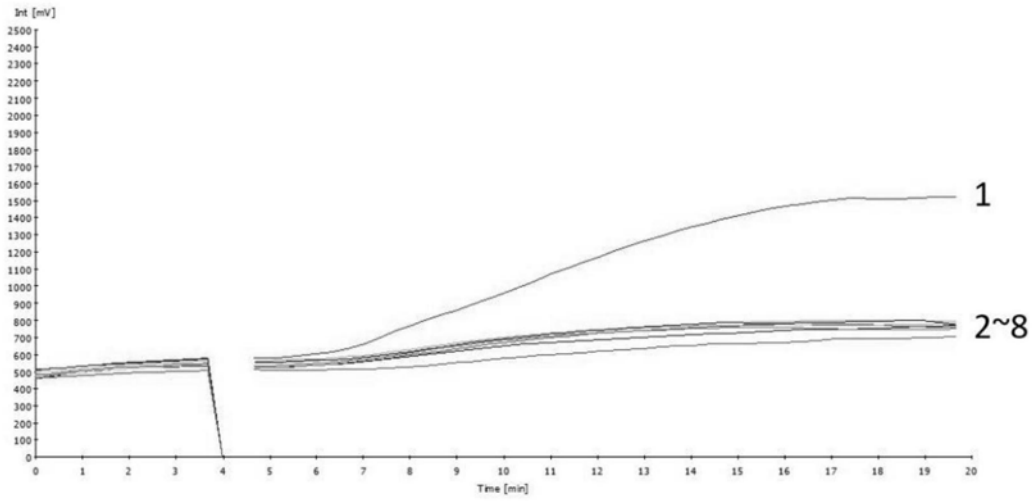


图19

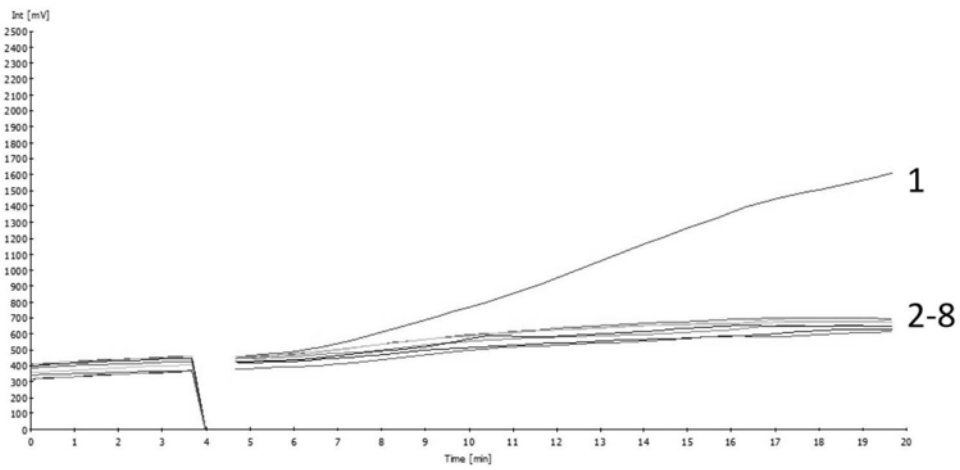


图20

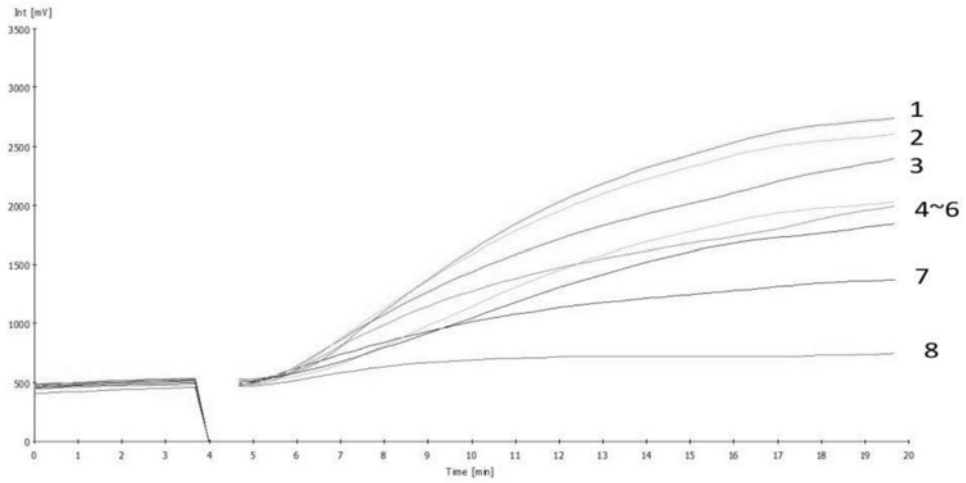


图21

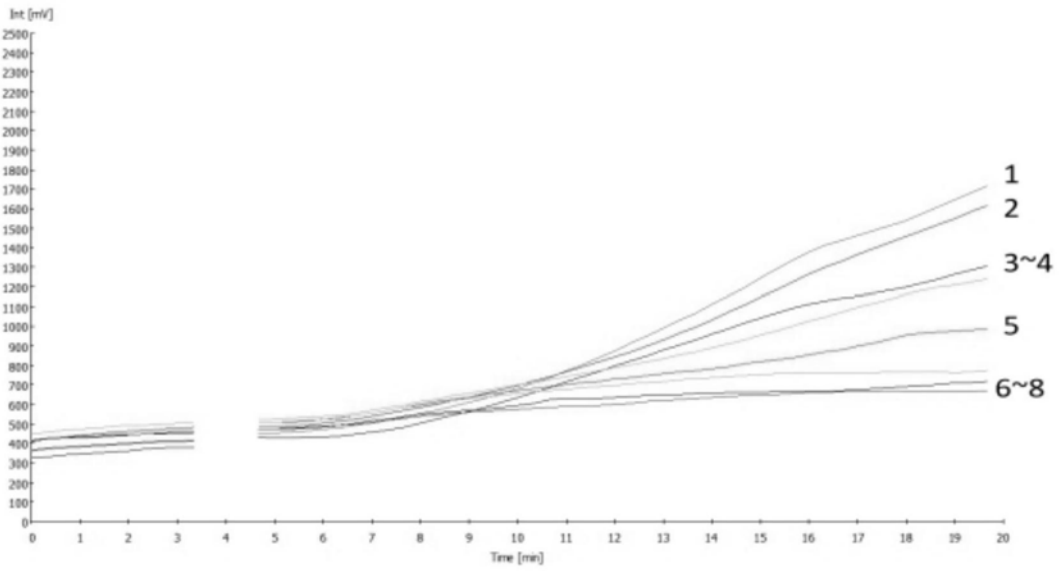


图22