



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102952861 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 201110248327. 7

(22) 申请日 2011. 08. 26

(73) 专利权人 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心

地址 518045 广东省深圳市福强路 1011 号

(72) 发明人 章桂明 向才玉 凌杏园 潘广程颖慧 康林 李鹤遥

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 罗瑶

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

G01N 30/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101646782 A, 2010. 02. 10, 权利要求书, 实施例.

CN 1332246 A, 2002. 01. 23, 权利要求书, 实施例.

CN 101812517 A, 2010. 08. 25, 权利要求书, 实施例.

CN 101812517 A, 2010. 08. 25, 权利要求书, 实施例.

CN 1332246 A, 2002. 01. 23, 权利要求书, 实施例.

韩宗福等. 利用变性高效液相色谱 (dHPLC) 进行小麦等位基因差异表达分析. 《自然科学进展》. 2008, 第 18 卷 (第 11 期), 1256-1263.

白月等. 应用多重 PCR-DHPLC 方法快速检测转基因马铃薯及 EH92-527-1 品系鉴定. 《中国马铃薯》. 2011, 第 25 卷 (第 3 期), 129-134.

白月等. 多重 PCR 结合变性高效液相色谱技术转基因小麦检测方法的建立. 《麦类作物学报》. 2011, 第 31 卷 (第 4 期), 577-581.

HY Huang et al. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods. 《J. Agric. Food Chem. 》. 2004, 第 53 卷 3264-3268.

HY Huang et al. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods. 《J. Agric. Food Chem. 》. 2004, 第 53 卷 3264-3268.

审查员 曲凯

权利要求书2页 说明书6页  
序列表8页 附图1页

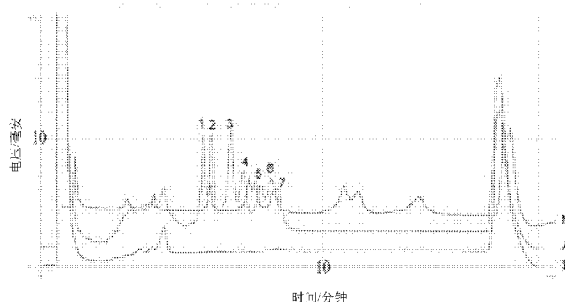
(54) 发明名称

转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测引物及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种转基因玉米的多重 PCR-DHPLC 检测引物及检测方法, 所述引物具有较强的特异性, 能够用于多重 PCR 扩增以及 DHPLC 分析. 所述检测方法提供了一种操作简便、扩展性能好、灵敏度高的转基因玉米检测方法, 实现了转基因玉米的多靶标检测. 利用 DHPLC 对 PCR 扩增产物进行分析, 其片段大小区分率可达数个碱基, 分辨率高. 本发明的引物和检测方法为转基因玉米多靶标检测提供了一种简单、方便、有效、可靠的高通量检测方法, 特别适合用于口岸检验检疫等部门使用.

CN 102952861 B



1. 用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测的引物,其特征在於:所述引物包括引物对 1、引物对 2、引物对 3、引物对 4、引物对 5、引物对 6 和引物对 7;

引物对 1 的上游引物含有 Seq ID No. 1 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 2 所示序列;

引物对 2 的上游引物含有 Seq ID No. 3 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 4 所示序列;

引物对 3 的上游引物含有 Seq ID No. 5 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 6 所示序列;

引物对 4 的上游引物含有 Seq ID No. 7 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 8 所示序列;

引物对 5 的上游引物含有 Seq ID No. 9 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 10 所示序列;

引物对 6 的上游引物含有 Seq ID No. 11 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 12 所示序列;

引物对 7 的上游引物含有 Seq ID No. 13 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 14 所示序列;

Seq ID No. 1 :5' -TTATTTTGGACTATCCCGACTCTC-3'

Seq ID No. 2 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGAGATAACAGGATCCACTCAAACAC-3'

Seq ID No. 3 :5' -AACTATTGACCCTACTTGTTCCGGAT-3'

Seq ID No. 4 :5' -TCGGCAGAGGCATCTTGAAT-3'

Seq ID No. 5 :5' -CGTCAACGTGCCCGGTACT-3'

Seq ID No. 6 :5' -AAAGGACCTGACTGCTCGCA-3'

Seq ID No. 7 :5' -GGCAGCTACGACATGATACTCCT-3'

Seq ID No. 8 :5' -CCGAGGAGGTTTCCGGATATTA-3'

Seq ID No. 9 :5' -TTTTCTGTACTTGTGTAATCGGCTAA-3'

Seq ID No. 10 :5' -AGTTGACCATCCAAACCCGA-3'

Seq ID No. 11 :5' -TCTGCGCACGCAATTCAAC-3'

Seq ID No. 12 :5' -CGTTGTGGTCTCCATCCTCTTAC-3'

Seq ID No. 13 :5' -AAGCGAACGATTCAGATGGC-3'

Seq ID No. 14 :5' -CGTTTCCCGCCTTCAGTTTA-3'。

2. 根据权利要求 1 所述的引物,其特征在於:所述引物对 3、引物对 4、引物对 5 和引物对 6,其上游引物的 5' 端还包括 Seq ID No. 15 所示序列,其下游引物的 5' 端还包括 Seq ID No. 16 所示序列;

Seq ID No. 15 :5' -CGTGGCCTCGCGATCTGACT-3'

Seq ID No. 16 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGA-3'。

3. 根据权利要求 2 所述的引物,其特征在於:

所述引物对 3 的上游引物具有 Seq ID No. 17 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 18 所示序列;

引物对 4 的上游引物具有 Seq ID No. 19 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 20 所示

序列；

引物对 5 的上游引物具有 Seq ID No. 21 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 22 所示序列；

引物对 6 的上游引物具有 Seq ID No. 23 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 24 所示序列；

Seq ID No. 17 :5' -CGTGGCCTCGCGATCTGACTCGTCAACGTGCCCGGTACT-3'

Seq ID No. 18 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGAAAAGGACCTGACTGCTCGCA-3'

Seq ID No. 19 :5' -CGTGGCCTCGCGATCTGACTGGCAGCTACGACATGATACTCCT-3'

Seq ID No. 20 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGACCGAGGAGGTTTCCGGATATTA-3'

Seq ID No. 21 :5' -CGTGGCCTCGCGATCTGACTTTTTCTGTACTTGTGTAATCGGCTAA-3'

Seq ID No. 22 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGAAGTTGACCATCCAAACCCGA-3'

Seq ID No. 23 :5' -CGTGGCCTCGCGATCTGACTTCTGCGCACGCAATTCAAC-3'

Seq ID No. 24 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGACGTTGTGGTCTCCATCCTCTTAC-3'。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的引物,其特征在于：

所述引物对 1 为检测转基因玉米品系 NK603 的引物,

引物对 2 为检测转基因玉米品系 MON863 的引物,

引物对 3 为检测转基因玉米品系 MON810 的引物,

引物对 4 为检测转基因玉米品系 T25 的引物,

引物对 5 为检测转基因玉米品系 MON88017 的引物,

引物对 6 为检测转基因玉米品系 MIR604 的引物,

引物对 7 为检测转基因玉米品系 59122 的引物。

5. 一种用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测方法,其特征在于:所述检测方法包括采用权利要求 1-4 任一项所述的引物,以玉米 DNA 为模板进行 PCR 扩增,并对 PCR 扩增产物进行变性高效液相色谱分析。

6. 根据权利要求 5 所述的检测方法,其特征在于:所述检测方法还包括以 marker 为参考标准进行变性高效液相色谱分析,将 PCR 扩增产物的变性高效液相色谱分析结果与 marker 的变性高效液相色谱分析结果进行比对。

## 转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测引物及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种转基因产品的检测,特别是涉及一种转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测引物及检测方法。

### 背景技术

[0002] 目前对转基因玉米的检测方法主要采用多重 PCR,多重实时荧光 PCR、PCR-基因芯片等检测方法。传统的多重常规 PCR 检测方法在平台扩展方法具有一定的局限性,随着待检目标的增加,需要对体系中的每套引物的用量及比例重新进行优化,并且兼顾扩增效率等因素,工作量较大;另一方面,通常采用的凝胶电泳分析扩增产物的方法,区分效率不高,检测结果不理想。多重实时荧光 PCR 虽然在检测灵敏度等方面较多重常规 PCR 检测方法有优势,但是由于目前仪器自身及荧光染料研制的限制,仅能同时提供互不干扰的 4 个荧光通道,也限制了该技术在检测通量扩展。常规的多套 PCR-基因芯片检测方法,需要多套引物进行扩增,操作步骤繁琐,并不适合大规模的高通量检测。变性高效液相色谱技术(Denaturing High-performance Liquid Chromatography, DHPLC)是一种简单、快速、非凝胶的核酸分析方法,具有扩展性强、分辨率好、灵敏度高等优点。该方法在 50℃ 条件下分析样品,样品峰的洗脱只由碱基对的数量决定洗脱顺序,当过柱的乙腈浓度提高,核酸片段会根据分子量从小到大的顺序被洗脱出来。通过得到的洗脱峰与 marker 比较确定分子量大小,判定是否含有目标检测基因。目前,尚没有转基因玉米的 PCR 结合 DHPLC 的检测技术(PCR-DHPLC)。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测的引物。

[0004] 本发明的另一目的是提供一种基于上述引物的扩展性能好、灵敏度和分辨率高的转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0006] 本发明公开了用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测的引物,所述引物包括引物对 1、引物对 2、引物对 3、引物对 4、引物对 5、引物对 6 和引物对 7 中的至少一对引物;引物对 1 的上游引物含有 Seq ID No. 1 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 2 所示序列;引物对 2 的上游引物含有 Seq ID No. 3 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 4 所示序列;引物对 3 的上游引物含有 Seq ID No. 5 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 6 所示序列;引物对 4 的上游引物含有 Seq ID No. 7 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 8 所示序列;引物对 5 的上游引物含有 Seq ID No. 9 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 10 所示序列;引物对 6 的上游引物含有 Seq ID No. 11 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 12 所示序列;引物对 7 的上游引物含有 Seq ID No. 13 所示序列,下游引物含有 Seq ID No. 14 所示序列。

[0007] 需要指出的是,上述 Seq ID No. 1 至 Seq ID No. 14 是与转基因玉米品系的检测靶标序列互补配对的特异序列,具有很强的特异性识别性。

[0008] 进一步的,所述引物对 3、引物对 4、引物对 5 和引物对 6,其上游引物的 5' 端还包括 Seq ID No. 15 所示序列,其下游引物的 5' 端还包括 Seq ID No. 16 所示序列;

[0009] Seq ID No. 15 :5' -CGTGGCCTCGCGATCTGACT-3'

[0010] Seq ID No. 16 :5' -CTCAGCGGCGGAGCTACAGA-3'。

[0011] 需要指出的是,上述 Seq ID No. 15 和 Seq ID No. 16 是分别在上游引物和下游引物的 5' 端添加的与检测靶标序列无关的一段序列,该序列可以是与检测靶标序列同源性很远的其它物种的序列,也可以是一段随机生成的序列。该序列可以用于调控 PCR 扩增产物的大小,以便于 PCR 扩增产物的进一步分析。

[0012] 本发明中,优选的,所述引物对 3 的上游引物具有 Seq ID No. 17 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 18 所示序列;引物对 4 的上游引物具有 Seq ID No. 19 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 20 所示序列;引物对 5 的上游引物具有 Seq ID No. 21 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 22 所示序列;引物对 6 的上游引物具有 Seq ID No. 23 所示序列,下游引物具有 Seq ID No. 24 所示序列。

[0013] 需要说明的是,所述 Seq ID No. 17 至 Seq ID No. 24 序列是由上述 Seq ID No. 5 至 Seq ID No. 12 序列分别在其 5' 端添加调控序列而成,尽管上述已经说明 Seq ID No. 15 和 Seq ID No. 16 所示调控序列可以是随机生成的序列,但是,并不是任意序列都可以添加,具体到本发明中,需要考虑调控序列与 Seq ID No. 5 至 Seq ID No. 12 所示序列的理化性质的统一协调,并且还需要考虑添加调控序列后的 Seq ID No. 17 至 Seq ID No. 24 所示序列作为检测引物的整体性能。

[0014] 本发明中,更优选的,所述引物对 1 为检测转基因玉米品系 NK603 的引物,引物对 2 为检测转基因玉米品系 MON863 的引物,引物对 3 为检测转基因玉米品系 MON810 的引物,引物对 4 为检测转基因玉米品系 T25 的引物,引物对 5 为检测转基因玉米品系 MON88017 的引物,引物对 6 为检测转基因玉米品系 MIR604 的引物,引物对 7 为检测转基因玉米品系 59122 的引物。

[0015] 本发明还公开了一种用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测方法,所述检测方法包括采用上述引物,以玉米 DNA 为模板进行 PCR 扩增,并对 PCR 扩增产物进行变性高效液相色谱分析(Denaturing High-performance Liquid Chromatography, HPLC)。

[0016] 进一步的,所述检测方法还包括以 marker 为参考标准进行变性高效液相色谱分析,将 PCR 扩增产物的变性高效液相色谱分析结果与 marker 的变性高效液相色谱分析结果进行比对。

[0017] 优选的上述检测方法包括如下步骤:

[0018] (A) 采用上述引物,以玉米 DNA 为模板,进行 PCR 扩增;

[0019] (B) 以步骤 (A) 的 PCR 扩增产物为样品进行 DHPLC 分析,同时以 marker 为参考标准进行 DHPLC 分析;

[0020] (C) 将步骤 (B) 中样品的 DHPLC 分析结果与 marker 的 DHPLC 分析结果进行比较,确定样品的分子量大小,从而判断是否含有检测的靶标序列。

[0021] 由于采用以上技术方案,本发明的有益效果在于:

[0022] 本发明的转基因玉米多重检测引物具有较强的特异性,能够用于后续的多重 PCR 扩增以及 DHPLC 分析。本发明针对传统的电泳分析 PCR 扩增结果不理想的问题,将 PCR 与

DHPLC 相结合,提供了一种操作简便、扩展性能好、灵敏度和分辨率高的转基因玉米多重检测方法,实现了转基因玉米的多靶标检测。利用 DHPLC 对 PCR 扩增产物进行分析,对不同大小的 PCR 产物片段区分率可达数个碱基,甚至能够区分出 1 个碱基大小差异的片段。本发明的引物和检测方法为转基因玉米品系 BT11 检测提供了一种简单、方便、有效、可靠的高通量检测方法,特别适合用于口岸检验检疫等部门使用。

#### 附图说明

[0023] 图为本发明实施例中 DHPLC 分析的部分结果,其中 1 转基因玉米品系 MON863 的洗脱峰、2 为转基因玉米品系 NK603 的洗脱峰、3 为转基因玉米品系 MON810 的洗脱峰、4 为转基因玉米品系 T25 的洗脱峰、5 为转基因玉米品系 MON88017 的洗脱峰、6 为转基因玉米品系 MIR604 的洗脱峰、7 为转基因玉米品系 59122 的洗脱峰;曲线 A 为 7 个品系的特异性引物以 7 个品系的 DNA 混合模板进行的 7 重 PCR 扩增产物的 DHPLC 洗脱曲线、曲线 B 为 7 个品系的特异性引物以非转基因玉米为模板进行的 7 重 PCR 扩增产物的 DHPLC 洗脱曲线,曲线 M 为 marker, marker 的各峰值从左至右依次为 80bp、102bp、174bp、257bp、267bp、296bp、434bp、458bp、587bp。

#### 具体实施方式

[0024] 本发明公布了用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测的引物,该引物针对转基因玉米品系的特异序列进行设计。包括引物对 1、引物对 2、引物对 3、引物对 4、引物对 5、引物对 6 和引物对 7 中的至少一个。进一步的,还在引物对 3、引物对 4 引物对 5 和引物对 6 的上游和下游分别添加了一段与检测靶标序列无关或者同源性很远的调控序列,用于实现对扩增产物的片段大小的调控。需要指出的是,调控序列的加入只是为了获得更优异的检测效果,因此,本发明优选的,对引物对 3-6 添加调控序列,分别具有 Seq ID No. 17 至 Seq ID No. 24 所示序列。

[0025] 本发明还公开了一种用于转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测方法,所述检测方法包括采用所述引物,以玉米 DNA 为模板进行 PCR 扩增,对 PCR 扩增产物进行变性高效液相色谱分析。进一步的,所述检测方法还包括以 marker 为参考标准进行变性高效液相色谱分析,将 PCR 扩增产物的变性高效液相色谱分析结果与 marker 的变性高效液相色谱分析结果进行比对,根据比对结果判断 PCR 扩增产物的大小,从而判断是否含有检测的靶标序列。本发明中,引物对 1 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 141bp,引物对 2 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 164bp,引物对 3 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 220bp,引物对 4 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 241bp,引物对 5 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 267bp,引物对 6 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 283bp,引物对 7 扩增产物的 DHPLC 洗脱峰为 196bp。

[0026] 下面通过具体实验例并结合附图对本发明作进一步详细说明。以下实验例仅仅对本发明进行进一步的说明,不应理解为对本发明的限制。

[0027] 实施例 1 DNA 提取

[0028] 采用 CTAB 法提取样品 DNA,具体如下:

[0029] a) 称取样品 5g,在研钵中加入液氮研磨至样品呈 0.5mm 左右大小的粉末;

[0030] b) 称取 300mg 磨碎的样品,迅速转入 2mL 离心管中,加 65℃ 预热的 CTAB 提取液

700  $\mu$  L, 混匀, 放入 65°C 水浴锅中水浴 30min;

[0031] c) 加 5  $\mu$  L RNase (10mg/mL), 37°C 水浴 30min;

[0032] d) 加入等体积 Tris 饱和酚, 充分混匀, 12000r/min 离心 15min;

[0033] e) 取上清, 加入等体积的氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 混匀, 12000r/min 离心 15min;

[0034] f) 取上清, 加入等体积的氯仿 / 异戊醇 (24 : 1) 混匀, 12000r/min 离心 15min;

[0035] g) 加入等体积预冷的异丙醇, 轻轻摇晃, 置于 -20°C 冰箱静置 30min, 12000r/min 离心 15min;

[0036] h) 弃上清, 加 70% 乙醇 500  $\mu$  L, 12000r/min 离心 3min, 去上清, 重复 2 次;

[0037] i) 得到 DNA 沉淀, 用冷冻干燥仪进行干燥, 加入 50  $\mu$  L ~ 100  $\mu$  L TE 或无菌去离子水, 充分溶解后, 测量 DNA 的纯度和浓度后置于 -20°C 冰箱中保存。

[0038] 实施例 2 DNA 浓度测定

[0039] 对提取的样品 DNA 进行浓度和纯度测定; 采用紫外分光光度计测定 260nm 和 280nm 处吸收值, 分别计算核酸的纯度和浓度, 计算公式如下:

[0040] DNA 纯度 = OD260/OD280

[0041] DNA 浓度 = 50  $\times$  OD260mg/mL

[0042] DNA 的纯度比值在 1.7 ~ 1.9 之间, 浓度大于 10ng/ $\mu$  L。

[0043] 实施例 3 PCR 扩增

[0044] 根据转基因玉米品系 MON863、NK603、MON810、T25、MON88017、MIR604、59122 设计特异性检测引物的结合位点, 并在 MON810、T25、MON88017、MIR604 品系的特异性检测引物结合位点的 5' 端添加调控序列, 合成含有调控序列的检测引物 (表 1), 合成引物对 1 上 / 下游引物特异性结合位点、引物对 2 上 / 下游引物特异性结合位点、引物对 7 上 / 下游引物特异性结合位点以及添加调控序列的引物对 3 上 / 下游引物、添加调控序列的引物对 4 上 / 下游引物、添加调控序列的引物对 5 上 / 下游引物、添加调控序列的引物对 6 上 / 下游引物的作为引物进行 PCR 扩增, PCR 样品设置包括, 上述 7 个转基因玉米品系 DNA 的混合样品和非转基因玉米的 DNA。

[0045] 表 1 转基因玉米检测引物结合位点及引物

[0046]

名称	序列 5'-3'	Seq ID No.
引物对 1 上游引物	TTATTTTGGACTATCCCGACTCTC	1
结合位点及加调控序列的下游引物	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGAGATAACAGGATCCACTCAAACAC	2
引物对 2 上/下游引	AACTATTGACCCTACTTGTTTCGGAT	3

[0047]

物特异性结合位点	TCGGCAGAGGCATCTTGAAT	4
引物对 3 上/下游引	CGTCAACGTGCCCGGTACT	5
物特异性结合位点	AAAGGACCTGACTGCTCGCA	6
引物对 4 上/下游引	GGCAGCTACGACATGATACTCCT	7
物特异性结合位点	CCGAGGAGGTTTCCGGATATTA	8
引物对 5 上/下游引	TTTTCTGTACTTGTGTAATCGGCTAA	9
物特异性结合位点	AGTTGACCATCCAAACCCGA	10
引物对 6 上/下游引	TCTGCGCACGCAATTCAAC	11
物特异性结合位点	CGTTGTGGTCTCCATCCTCTTAC	12
引物对 7 上/下游引	AAGCGAACGATTCAGATGGC	13
物特异性结合位点	CGTTTCCCGCCTTCAGTTTA	14
上游引物调控序列	CGTGGCCTCGCGATCTGACT	15
下游引物调控序列	CTCAGCGGCGGAGCTACAGA	16
添加调控序列的引	CGTGGCCTCGCGATCTGACTCGTCAACGTGCCCGGTACT	17
物对 3 上/下游引物	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAAAAGGACCTGACTGCTCGCA	18
添加调控序列的引	CGTGGCCTCGCGATCTGACTGGCAGCTACGACATGATACTCCT	19
物对 4 上/下游引物	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACCGAGGAGGTTTCCGGATATTA	20
添加调控序列的引	CGTGGCCTCGCGATCTGACTTTTTCTGTACTTGTGTAATCGGCTAA	21
物对 5 上/下游引物	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAAGTTGACCATCCAAACCCGA	22
添加调控序列的引	CGTGGCCTCGCGATCTGACTTCTGCGCACGCAATTCAAC	23
物对 6 上/下游引物	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACGTTGTGGTCTCCATCCTCTTAC	24

[0048] PCR反应体系总体积为 50  $\mu$  L,各成分分别为:多重PCR反应混合液Multiplex PCR Mix(TaKaRa) 25  $\mu$  L, 10  $\mu$  mol/L 引物各 1  $\mu$  L, DNA 2  $\mu$  L, 5U/ $\mu$  L Taq 酶 0.25  $\mu$  L, 用灭菌双蒸水补足为 50  $\mu$  L。

[0049] PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 变性 1min; 然后进入 35 个循环,94  $^{\circ}$ C 30s,57  $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

[0050] 实施例 4DHPLC 检测

[0051] 将 PCR 产物置于 DHPLC 的自动进样平台上;打开 DHPLC 控制软件 Navigator,在检测方法中选择 Multiplex,即多片段分析,同时设定检测上限为 600bp,下限为 70bp;运行两个 blank,即空针,平衡色谱柱;运行一个 marker,用于参考对照,检测样品的核酸片段大小;依次对待测样本进行分析,部分结果见图 1。

[0052] 结果判断:观察 DHPLC 得到的洗脱峰,通过与 marker 比对及 WAVE 4500 自动分析确定洗脱峰位置的 DNA 片段大小,据此进行判断。

[0053] 洗脱峰 141bp 为引物对 1 的扩增产物,洗脱峰 164bp 为引物对 2 的扩增产物,洗脱



峰 220bp 为引物对 3 的扩增产物,洗脱峰 241bp 为引物对 4 的扩增产物,洗脱峰 267bp 为引物对 5 的扩增产物,洗脱峰 283bp 为引物对 6 的扩增产物,洗脱峰 196bp 为引物对 7 的扩增产物。对混合转基因玉米品系 DNA 的样品,其检测结果显示含有上述 7 个洗脱峰;而非转基因玉米样品无洗脱峰。

[0054] 以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

[0001]

## 核 苷 酸 和 氨 基 酸 序 列 表

## 核 苷 酸 序 列 表

&lt;110&gt; 深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心

&lt;120&gt; 转基因玉米多重 PCR-DHPLC 检测引物及检测方法

&lt;130&gt; DHC1110307

&lt;160&gt; 24

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

ttattttgga ctatcccgac tctc

24

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 2

ctcagcggcg gagctacaga gagataacag gatccactca aacac

45

[0002]

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

aactattgac cctactgtt cggat

25

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

tcggcagagg catcttgaat

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

cgtaacgtg cccgtact

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<400> 6

aaaggacctg actgctcgca

20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ggcagctacg acatgatact cct

23

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

ccgaggaggt ttccgatat ta

22

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

ttttctgtac ttgtgtaac ggctaa

26

[0004]

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

agttgacat ccaaaccga

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

tctgcgacg caattcaac

19

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

cgttgtggtc tccatcctct tac

23

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

[0005]

<213> 人工序列

<400> 13

aagcgaacga ttcagatggc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

cgttcccgc cttcagtta

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

cgtggcctcg cgatctgact

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 16

ctcagcggcg gagctacaga

20

[0006]

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

cgtagcctcg cgatctgact cgtcaacgtg cccgtact

39

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

ctcagcggcg gagctacaga aaaggacctg actgctcgca

40

<210> 19

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

cgtagcctcg cgatctgact ggcagctacg acatgatact cct

43

<210> 20

<211> 42

[0007]

<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<400> 20  
ctcagcggcg gagctacaga ccgaggaggt ttccggatat ta 42

<210> 21  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<400> 21  
cgtggcctcg cgatctgact tttctgtac ttgttaatc ggctaa 46

<210> 22  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<400> 22  
ctcagcggcg gagctacaga agttgacat ccaaaccga 40

<210> 23  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
  
<400> 23

[0008]



---

cgtggcctcg cgatctgact tctgcgcacg caattcaac 39

<210> 24

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 24

ctcagcggcg gagctacaga cgttgtggtc tccatcctct tac 43

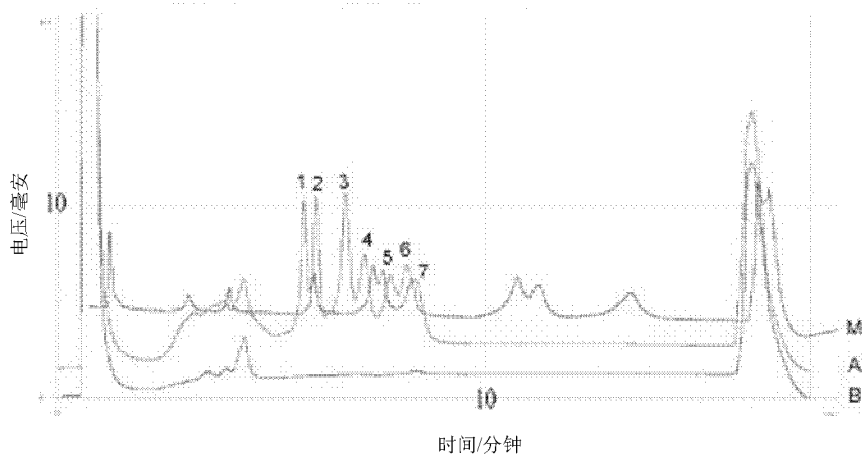


图 1