



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104745685 B

(45)授权公告日 2017. 11. 03

(21)申请号 201510034609.5

(22)申请日 2015.01.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104745685 A

(43)申请公布日 2015.07.01

(73)专利权人 黄埔出入境检验检疫局综合技术
服务中心
地址 510730 广东省广州经济技术开发区
创业路17号

(72)发明人 刘二龙 吕英姿 卢丽 蒋湘
樊武疆 姚柏辉 王定国 苏彩珠
唐婕 林惠娇 郑高彬 林学勤
符其娇 秦焯敏

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102
代理人 任重

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

(56)对比文件

CN 103857798 A, 2014.06.11, 全文.

US 2006/0272042 A1, 2006.11.30, 说明书
第56段、66-68段, 第70-73段、图1、2.

李燕等. 紫花苜蓿MsZIP基因超表达载体的
构建及转基因苜蓿检测.《生物技术通报》.2012,
第21卷(第6期), 第182-189页.

李静等. 转基因苜蓿的研究进展.《生物技术
通报》.2012, (第11期), 第1-8页.

审查员 曹梦超

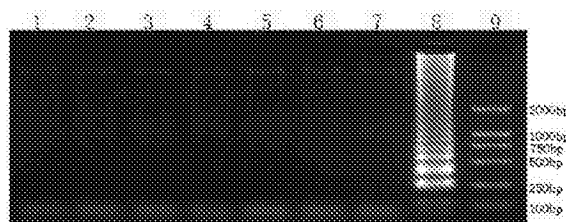
权利要求书1页 说明书6页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温
扩增检测用引物及检测方法和应用

(57)摘要

本发明公开了转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温扩增检测用引物及检测方法和应用。所述引物的序列分别如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.6所示。本发明针对我国农业部未颁发农业转基因生物安全证书的美国孟山都公司转基因苜蓿草品系J101, 首次提供了一组特异性引物, 以BstDNA聚合酶启动环介导等温扩增。通过对LAMP检测体系的优化, 成功建立了苜蓿草J101品系特异性LAMP快速检测体系, 操作简单, 特异性强, 灵敏度高, 检测结果准确, 检测最低拷贝数为10, 能够快速、准确、地对转基因苜蓿草J101成分进行检测分析和鉴定。



1. 一组转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温扩增检测用引物,其特征在於,所述引物为F3、B3、FIP、BIP、LF和LB,所述引物的序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示。

2. 权利要求1所述转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温扩增检测用引物在鉴别转基因苜蓿草J101品系方面的应用,其特征在於,所述鉴别是从常见检疫农作物中鉴别出转基因苜蓿草J101品系,所述常见检疫农作物为转基因苜蓿草J101品系、转基因玉米品系MIR162、转基因玉米品系89034、转基因玉米品系BT11、转基因大米cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦或非转基因大叶苜蓿。

3. 一种转基因苜蓿草J101品系特异性检测方法,其特征在於,包括以下步骤:

S1. 提取DNA作为反应的模板;

S2. 采用权利要求1所述引物F3、B3、FIP、BIP、LF和LB进行环介导等温扩增检测,根据检测结果进行判断;

其中,S2步骤所述环介导等温扩增检测的反应体系为25 μ L: 10 \times Thermopol buffer 2.5 μ L、10 μ M的F3和10 μ M的B3各0.5 μ L、40 μ M的FIP和40 μ M的BIP各1 μ L、40 μ M的LF和40 μ M的LB各0.5 μ L、10 mM的dNTPs 4 μ L、100 mM的MgSO₄ 1 μ L、8 U/ μ L的Bst DNA polymerase 1 μ L、Template DNA 1 μ L 和11.5 μ L ddH₂O;

S2步骤所述检测的反应程序为:63 $^{\circ}$ C恒温反应60min,85 $^{\circ}$ C加热2min使酶失活,反应即结束;

根据检测结果进行判断的方法为:方法一:根据颜色变化进行结果判断:向反应终体系加入0.2 μ L SYBR green I,1min观察结果,阳性反应呈现黄绿色,而阴性的反应保持橙色;或者,方法二:电泳检测判断:经过1.5%琼脂糖电泳检测,阳性反应的产物呈梯形条带,阴性反应没有梯形扩增条带出现。

4. 权利要求3所述转基因苜蓿草J101品系特异性检测方法的应用,其特征在於,应用于从常见检疫农作物中鉴别出转基因苜蓿草J101品系,所述常见检疫农作物为转基因苜蓿草J101品系、转基因玉米品系MIR162、转基因玉米品系89034、转基因玉米品系BT11、转基因大米cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦或非转基因大叶苜蓿。

转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温扩增检测用引物及检测方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地,涉及一种转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温扩增(LAMP)检测用引物及检测方法和应用。

背景技术

[0002] 转基因苜蓿草J101品系由孟山都公司开发的耐除草剂的转基因品系,2005年美国 and 加拿大批准环境释放和作为饲料应用,目前还未获得我国转基因生物安全证书,尚未批准其进口。

[0003] 转基因苜蓿通过饲料进入动物养殖的食物链,致使牛奶、肉等制品成为转基因食品,可能对于人的健康产生影响。根据《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物进口安全评价管理办法》、《农业转基因生物进口安全管理办法》和《农业转基因生物标识管理办法》,凡是在中国境内销售的转基因生物,必须进行标识。对转基因产品标识需要检测方法的支撑。目前对转基因产品基于核酸基础上的检测可以分为4种检测策略:1) 筛查法:对转基因产品中的启动子中的启动子、终止子等通用基因进行筛查;2) 基因特异性检测:对转基因产品中的外源目的基因进行检测;3) 构建特异性检测:对外源目的基因与启动子或终止子的特异连接序列进行检测;4) 品系特异性/转化事件特异性检测:对外源片段与宿主基因组DNA特异连接序列进行检测。

[0004] 由于启动子、终止子、目的基因可以有多种组合关系,同一组合转化同一植物也可产生不同转化事件,特别对于进境监管,同一种作物有些转基因品系是允许进口,而有些品系可能由于某种原因没有区得准入。因此筛查法、基因特异性检测和构建特异性检测具有局限性,不能完全满足转基因产品身份验证等检测、监测和安全管理的需求。而品系特异性/转化事件是指某个外源基因表达框(或片段)插入到宿主基因组某个位置而形成的稳定遗传转化。因此转化事件一旦发生就具有唯一性,针对转化事件的检测可以起到身份识别的作用。

[0005] 2000年,Notomi等开发了环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP),其原理是针对目的核酸片段的设计特异性引物,利用一种链置换DNA聚合酶在约62℃进行等温扩增。该方法具有灵敏度高,特异性好,反应时间短,判定结果方便、不需要昂贵仪器等优势。但是,针对不同的检测对象,引物的筛选以及针对性的扩增和检测条件是获得高灵敏度、高特异性结果的关键,对于同一种检测对象,采用不同的引物组合,其检测结果也相差甚远。目前未见到有转基因苜蓿草J101该作物品系特异性LAMP可视化检测方法相关文献报道。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是针对现有转基因苜蓿草采用的筛查检测技术不能准确地检测具体的转基因品系的不足,提供一组转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP检测用引

物,该组引物具有高特异性和灵敏度,基于所述引物及其组合,本发明可成功建立转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP可视化检测方法。

[0007] 本发明要解决的另一技术问题是提供转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP可视化检测方法。

[0008] 本发明还一要解决的技术问题是提供所述检测方法的应用。

[0009] 本发明的上述目的通过以下技术方案予以实现:

[0010] 本发明通过创造性地分析和大量实验研究总结,在转基因苜蓿草J163品系的3'端外源插入片段E9 3与苜蓿草基因组DNA之间的邻接区序列,结合序列信息的分析,设计得到一组共六条特异性的引物。并确定了精确地检测步骤和条件,建立特异性强、灵敏度高的转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP可视化检测方法,满足转基因产品身份验证等检测、监测和安全管理的需求。

[0011] 具体地,本发明提供一组转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP检测用引物F3、B3、FIP、BIP、LF和LB,所述引物的序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示:

[0012] SEQ ID NO.1:F3:5' -TTCCAGAATCCTTGTCAGATTC-3'。

[0013] SEQ ID NO.2:B3:5' -GCTGGAATTAGCAAGATAAG-3'。

[0014] SEQ ID NO.3:FIP:5' -ATCGATGCGGCCACCACTGACTTGCCAATTGATTGACAAC-3'。

[0015] SEQ ID NO.4:BIP:5' -CCCATTTGGACGTGAATGTAGATTAATGCATACGATCCGTCCG-3'。

[0016] SEQ ID NO.5:LF:5' -GGCTGCAGGTCGATTGAT-3'。

[0017] SEQ ID NO.6:LB:5' -CACGTCGAAATAAAGATTTCCG-3'。

[0018] 本发明同时提供一种转基因苜蓿草J101品系特异性实时荧光PCR检测方法,包括以下步骤:

[0019] S1.提取DNA作为反应的模板;

[0020] S2.采用所述引物F3、B3、FIP、BIP、LF和LB进行LAMP可视化检测,根据检测结果进行判断;

[0021] 其中,S2步骤所述实时荧光PCR检测反应体系为25 μ L:10 \times Thermopol buffer2.5 μ L、F3和B3各0.5 μ L(10 μ M)、FIP和BIP各1 μ L(40 μ M)、LF和LB各0.5 μ L(40 μ M)、dNTPs 4 μ L(10mM)、MgSO₄ 1 μ L(100mM)、Bst DNA polymerase 1 μ L(8U/ μ L)、Template DNA1 μ L和11.5 μ L ddH₂O。

[0022] S2步骤所述检测的反应程序为:63 $^{\circ}$ C恒温反应60min,85 $^{\circ}$ C加热2min使酶失活,反应即结束。

[0023] 优选地,S2步骤所述实时荧光PCR检测反应体系中MgSO₄浓度为2mM。

[0024] 根据检测结果进行判断的方法可以采用以下两种方法的其中之一:

[0025] 方法一:根据颜色变化进行结果判断:向反应终体系加入0.2 μ LSYBR green I,1min观察结果,阳性反应呈现黄绿色,而阴性的反应保持橙色;

[0026] 方法二:电泳检测判断:根据LAMP法扩增的产物是各种不同长度的茎-环状结构DNA,因此阳性反应的产物经过1.5%琼脂糖电泳检测呈梯形条带,而阴性反应则没有梯形扩增条带出现。

[0027] 本发明同时提供了所述方法的应用,应用于鉴别转基因苜蓿草J101品系与其他作

物。尤其是应用于与转基因玉米品系MIR162、转基因玉米品系89034、转基因玉米品系BT11、转基因大米cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦、非转基因大叶苜蓿的检测鉴别方面。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0029] 本发明根据苜蓿草终止子(E9-3)与内源苜蓿草基因组DNA邻接区序列,首次设计了J101品系特异性的LAMP检测用引物,外引物F3和B3覆盖了邻接区区域,可以实现对J101品系特异性鉴别。本发明筛选的设计和筛选的引物组,首次实现成功采用LAMP方法对J101进行品系特异性的鉴定。

[0030] 本发明还对启动子与苜蓿草基因组DNA邻接区序列采用LAMPdesigner进行引物设计尝试,无法获得合适的LAMP反应的引物。

[0031] 本发明首次提供了一组共6条引物,该组引物对邻接区序列的6个特异序列区的识别,保证了本发明检测方法LAMP扩增的高度特异性;本发明设计的环引物使得扩增效率进一步大大提高,耗时短,在1h内可实现对J101品系的鉴定。

[0032] 本发明的扩增体系均在等温条件下采用特异性酶进行扩增,对实验仪器要求低,检测成本低;通过加入显色染料,无需借助仪器,可通过肉眼快速观察结果,利于现场的临床样品快速可视化检测。

[0033] 进一步地,本发明成功建立了苜蓿草J101品系特异性LAMP检测体系,操作简单、检测结果准确。通过对苜蓿草J101等农作物进行的特异性试验表明,本发明建立LAMP方法仅对苜蓿草J101品系的检测结果为阳性;检测最低DNA浓度为(limit of detection, LOD)为16pg,相当于10拷贝转基因苜蓿草J101基因组DNA;

[0034] 本发明建立的转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP可视化检测方法特异性好,灵敏度高,能够快速、准确、稳定地对转基因苜蓿草J101成分进行检测分析。

附图说明

[0035] 图1是转基因苜蓿J101品系外源插入片段示意图,A为扩增区域。

[0036] 图2转基因苜蓿J101品系外源插入片段E9-3与内源苜蓿草基因组DNA邻

[0037] 接区LAMP引物的位置:下划线部分为苜蓿草基因组DNA部分序列,加粗碱基为E9-3部分序列。

[0038] 图3是J101品系特异性LAMP特异性试验结果(颜色判断),其中8为J101,

[0039] 1~7为转基因玉米品系MIR162、转基因玉米品系89034、转基因玉米品系BT11、转基因大米cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦、非转基因大叶苜蓿。

[0040] 图4是J101品系特异性LAMP特异性试验结果(电泳),其中8为J101,

[0041] 1~7为转基因玉米品系MIR162、转基因玉米品系89034、转基因玉米品系BT11、转基因大米cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦、非转基因大叶苜蓿。

[0042] 图5是J101品系特异性LAMP灵敏度试验结果(颜色),1~7分别为16ng、1.6ng、0.16ng、0.08ng、0.016ng、0.008ng和0.0016ng的J101基因组DNA模板。

[0043] 图6是J101品系特异性LAMP灵敏度试验结果(电泳),2~8分别为16ng、1.6ng、0.16ng、0.08ng、0.016ng、0.008ng和0.0016ng的J101基因组DNA模板。

具体实施方式

[0044] 下面结合附图和具体实施例进一步说明本发明方法。下述实施例和附图仅用于示例性说明,不能理解为对本发明的限制。除非特别说明,下述实施例中使用的生物材料、试剂原料为常规市购或商业途径获得的生物材料和试剂原料,除非特别说明,下述实施例中使用的方法和设备为本领域常规使用的方法和设备。

[0045] 实施例1:设计引物与筛选及LAMP检测体系成分

[0046] 本发明通过创造性分析结合大量实验研究,基于转基因苜蓿草J101品系的3'端外源插入片段E9-3与苜蓿草基因组DNA之间的邻接区序列,见附图1中A处所示。结合序列信息的分析,采用LAMPdesigner软件进行设计,获得一组特异性的LAMP引物,见附图2;建立特异性强、灵敏度高的转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP检测方法。

[0047] 本发明尝试采用J101品系基因组5'端Pe-FMV(启动子)端与苜蓿草基因组DNA邻接区序列设计LAMP引物,经生物信息学分析,无法得到合适的LAMP引物。

[0048] 在利用E9-3端与苜蓿草基因组序列设计时还得到另一组引物F3-2、B3-2、FIP(F1c+F2)-2、BIP(B1c+B2)-2、LoopF-2、LoopB-2,其序列分别如SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11和SEQ ID NO.12所示:

[0049] F3-2:CTCATGGATTTGTAGTTGAG

[0050] B3-2:GCTGGAATTAGCAAGATAAG

[0051] FIP(F1c+F2)-2:ATCGATGCGGCCACCACTGACTTGCCAATTGATTGACAAC

[0052] BIP(B1c+B2)-2:CCCATTTGGACGTGAATGTAGATTAATGCATACGATCCGTCG

[0053] LoopF-2:GGCTGCAGGTCGATTGAT

[0054] LoopB-2:CACGTCGAAATAAAGATTTCCG

[0055] 因为外引物B3-2所在位置所不能覆盖到E9-3与苜蓿草基因组DNA的邻接区域,虽然可以进行LAMP扩增,但无法建立J101品系特异性LAMP扩增体系。反应的结果不能达到品系特异性鉴定的目的。

[0056] 本发明确定的转基因苜蓿草J101品系特异性LAMP检测用引物F3、B3、FIP、BIP、LF和LB,其序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6所示:

[0057] SEQ ID NO.1:F3:5'-TTCCAGAATCCTTGTGATTC-3'。

[0058] SEQ ID NO.2:B3:5'-GCTGGAATTAGCAAGATAAG-3'。

[0059] SEQ ID NO.3:FIP:5'-ATCGATGCGGCCACCACTGACTTGCCAATTGATTGACAAC-3'。

[0060] SEQ ID NO.4:BIP:5'-CCCATTTGGACGTGAATGTAGATTAATGCATACGATCCGTCG-3'。

[0061] SEQ ID NO.5:LF:5'-GGCTGCAGGTCGATTGAT-3'。

[0062] SEQ ID NO.6:LB:5'-CACGTCGAAATAAAGATTTCCG-3'。

[0063] 所述引物可以采用本领域常规方法合成。本实施例应用的引物委托宝生物合成。本发明实施例所述LAMP检测使用的仪器为BIORAD S1000。

[0064] 本实施例中LAMP体系成分为:10×Thermopol buffer、F3、B3、FIP、BIP、LF和LB、dNTPs、MgSO₄、Bst DNA polymerase、Template DNA。

[0065] 实施例2:J101品系特异性LAMP检测体系反应温度的选择实验

[0066] 本实施例基于SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6引物,包括以下步骤:

[0067] S1.提取DNA作为反应的模板;称取100mg左右研磨成干粉的待测样品,使用天根植物基因组DNA提取试剂盒并按照其操作说明书提取基因组DNA。提取的基因组DNA用微量分光光度计nanodrop2000c测定浓度。提取的DNA溶液在-20℃保存备用。

[0068] S2.采用所述引物SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6进行LAMP可视化检测,根据检测结果进行判断;

[0069] 其中,S2所述LAMP检测反应体系为25μL:10×Thermopol buffer2.5μL、F3和B3各0.5μL(10μM)、FIP和BIP各1μL(40μM)、LF和LB各0.5μL(40μM)、dNTPs 4μL(10mM)、MgSO₄ 1μL(100mM)、Bst DNA polymerase 1μL(8U/μL)、Template DNA1μL和11.5μL ddH₂O。

[0070] S2所述检测的反应程序为:分别采用60℃,61℃,62℃,63℃,64℃,65℃按恒温反应60min,85℃加热2min使酶失活,反应即结束。

[0071] 根据LAMP法扩增的产物是各种不同长度的茎-环状结构DNA,因此阳性反应的产物经过1.5%琼脂糖电泳检测呈梯形条带,取3μL扩增产物经电泳检测结果显示63℃时扩增效果最好。

[0072] 实施例3:J101品系特异性LAMP检测体系Mg²⁺浓度的选择:

[0073] 本实施例基于SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6引物,包括以下步骤:

[0074] S1.提取DNA作为反应的模板;称取100mg左右研磨成干粉的待测样品,使用天根植物基因组DNA提取试剂盒并按照其操作说明书提取基因组DNA。提取的基因组DNA用微量分光光度计nanodrop2000c测定浓度。提取的DNA溶液在-20℃保存备用。

[0075] S2.采用所述引物SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5和SEQ ID NO.6进行LAMP可视化检测,根据检测结果进行判断;

[0076] 其中,S2所述LAMP检测反应体系为25μL:10×Thermopol buffer(1×)、F3和B3各10μM、FIP和BIP各40μM、LF和LB各40μM、dNTPs 10mM、MgSO₄、Bst DNA polymerase 8U/μL、Template DNA1μL,余量用ddH₂O补足。其中MgSO₄分别采用终浓度为1,2,4,6和8mM。

[0077] S2所述检测的反应程序为:按63℃恒温反应60min,85℃加热2min使酶失活,反应即结束。

[0078] 根据LAMP法扩增的产物是各种不同长度的茎-环状结构DNA,因此阳性反应的产物经过1.5%琼脂糖电泳检测呈梯形条带,取3μL扩增产物经电泳检测结果显示1,2mM时无梯形状带,4mM、6mM和8mM差别不明显,故体系中MgSO₄选择4mM浓度。

[0079] 实施例4:本发明方法的特异性试验

[0080] 本发明采用多种农作物进行特异性实验,以下以8种农作物,包括转基因苜蓿草J101品系、转基因玉米品系MIR162、转基因玉米品系89034、转基因玉米品系BT11、转基因大米cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦、非转基因大叶苜蓿的检测鉴别方面(均来自常规随机取样后储存,并不因此限定本发明范围)的基因组DNA为模板,采用本发明建立的转基因苜蓿J101品系特异性LAMP检测方法进行扩增反应(LAMP检测反应体系为25μL:10×Thermopol buffer2.5μL、F3和B3各0.5μL(10μM)、FIP和BIP各1μL(40μM)、LF和LB各0.5μL(40μM)、dNTPs 4μL(10mM)、MgSO₄ 1μL(100mM)、Bst DNA polymerase 1μL(8U/μL)、

Template DNA 1 μ L和11.5 μ L ddH₂O。检测的反应程序为：按63 $^{\circ}$ C恒温反应60min,85 $^{\circ}$ C加热2min使酶失活,反应即结束。),检测本发明建立的方法的特异性。观察扩增产物加入SYBR green I后颜色有无变黄绿色或电泳后有无特异性梯状带。实验结果见附图3和图4所示。实验结果表明,有且只有J101有特异性梯状带产生,其他无扩增条带;加入SYBR green I会有黄绿色变化(图3中序号为8的为黄绿色),其他种类为棕色(图3中序号为1~7的为棕色)。表明本发明建立的J101品系特异性的LAMP检测方法特异性良好。

[0081] 实施例5:本发明检测体系灵敏度测试

[0082] J101基因组DNA初始模板浓度经ND2000C微量分光光度计测得其浓度为200ng/ μ L。经TE稀释后对16ng/ μ L、1.6ng/ μ L、0.16ng/ μ L、0.08ng/ μ L、0.016ng/ μ L、0.008ng/ μ L和0.0016ng/ μ L的J163基因组DNA模板进行检测(LAMP检测反应体系为25 μ L:10 \times Thermopol buffer 2.5 μ L、F3和B3各0.5 μ L(10 μ M)、FIP和BIP各1 μ L(40 μ M)、LF和LB各0.5 μ L(40 μ M)、dNTPs 4 μ L(10mM)、MgSO₄ 1 μ L(100mM)、Bst DNA polymerase 1 μ L(8U/ μ L)、Template DNA 1 μ L和11.5 μ L ddH₂O。检测的反应程序为：按63 $^{\circ}$ C恒温反应60min,85 $^{\circ}$ C加热2min使酶失活,反应即结束。),以大于等于0.016ng/ μ L(16pg/ μ L)基因组DNA为模板时,扩增后产物经电泳有特征性梯状带,加入SYBR green I会有黄绿色产生。而以0.008ng/ μ L和0.0016ng/ μ L的J101基因组DNA模板时,则无上述反应结果。表明该LAMP体系可以检测J101基因组DNA的最低检测限为0.016ng(16pg/ μ L),由于苜蓿草的基因组DNA的估算为1510Mbp,相应的,重量大约估算为1.6pg(arumuganthan,K,1991)则可检测到10个拷贝的J101基因组DNA。扩增结果见附图5和图6所示(图5中序号1~5的为黄绿色,6~7的为棕色)。

[0001]	SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110> 中华人民共和国黄埔出入境检验检疫局	
[0003]	<120> 转基因苜蓿草J101品系特异性环介导等温扩增检测用引物及检测方法和应用	
[0004]	<130>	
[0005]	<160> 12	
[0006]	<170> PatentIn version 3.3	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 22	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 引物F3	
[0011]	<400> 1	
[0012]	ttccagaatc cttgtcagat tc	22
[0013]	<210> 2	
[0014]	<211> 20	
[0015]	<212> DNA	
[0016]	<213> 引物B3	
[0017]	<400> 2	
[0018]	gctggaatta gcaagataag	20
[0019]	<210> 3	
[0020]	<211> 40	
[0021]	<212> DNA	
[0022]	<213> 引物FIP	
[0023]	<400> 3	
[0024]	atcgatgcgg ccaccactga cttgccaatt gattgacaac	40
[0025]	<210> 4	
[0026]	<211> 42	
[0027]	<212> DNA	
[0028]	<213> 引物BIP	
[0029]	<400> 4	
[0030]	cccatttggga cgtgaatgta gattaatgca tacgatccgt cg	42
[0031]	<210> 5	
[0032]	<211> 18	
[0033]	<212> DNA	
[0034]	<213> 引物LF	
[0035]	<400> 5	
[0036]	ggctgcaggt cgattgat	18
[0037]	<210> 6	

[0038]	<211>	22	
[0039]	<212>	DNA	
[0040]	<213>	引物LB	
[0041]	<400>	6	
[0042]		cacgtcgaaa taaagatttc cg	22
[0043]	<210>	7	
[0044]	<211>	20	
[0045]	<212>	DNA	
[0046]	<213>	引物F3-2	
[0047]	<400>	7	
[0048]		ctcatggatt tgtagttgag	20
[0049]	<210>	8	
[0050]	<211>	20	
[0051]	<212>	DNA	
[0052]	<213>	引物B3-2	
[0053]	<400>	8	
[0054]		gctggaatta gcaagataag	20
[0055]	<210>	9	
[0056]	<211>	40	
[0057]	<212>	DNA	
[0058]	<213>	引物FIP (F1c+F2) -2	
[0059]	<400>	9	
[0060]		atcgatgcgg ccaccactga cttgccaatt gattgacaac	40
[0061]	<210>	10	
[0062]	<211>	42	
[0063]	<212>	DNA	
[0064]	<213>	引物BIP (B1c+B2) -2	
[0065]	<400>	10	
[0066]		cccatttggga cgtgaatgta gattaatgca tacgatecgt cg	42
[0067]	<210>	11	
[0068]	<211>	18	
[0069]	<212>	DNA	
[0070]	<213>	引物LoopF-2	
[0071]	<400>	11	
[0072]		ggctgcaggt cgattgat	18
[0073]	<210>	12	
[0074]	<211>	22	
[0075]	<212>	DNA	
[0076]	<213>	引物LoopB-2	

[0077] <400> 12

[0078] cacgtcgaaa taaagatttc cg

22

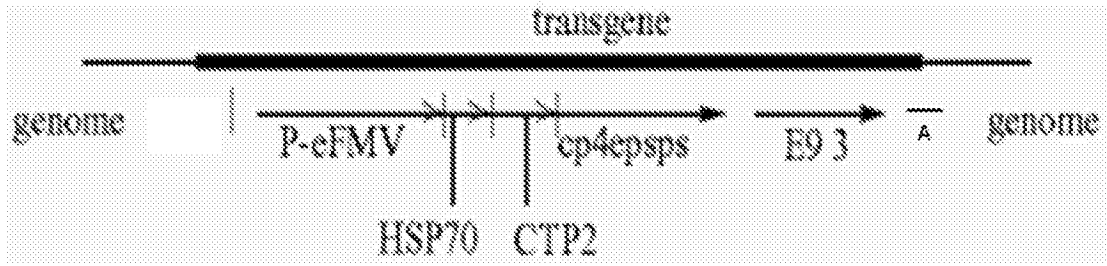


图1

GAACTTTCCTTTATGTAATTTCCAGAATCCTTGTCAAGATTC TAATCATTGCTTTAT
 AATTATAGTTATACTCATGGATTTGTAGTTGAGTATGAAAATATTTTTTAATGCATT
 TTATGACTTGCCAATTGATTGACAACATGCATCAATCGACCTGCAGCCACTCGAA
 GCGGCCGCCACTCGAGTGGTGGCCGCATCGATCGTGAAGTTTCTCATCTAAGCC
 CCCATTTGGACGTGAATGTAGACACGTCGAAATAAAGATTTCCGAATTAGAATAAT
 TTGTTATTGCTTTCGCCATAAATACGACGGATCGTATGCATTAAATATATAGAGGA
 ATTTCTTATCTTGCTAATTCAGCATAGTTATTTTTAATTTGTCAAATAAATTGTATGAATG
 ATATTCTACAACCTTCTCAIGCTTTTCAATAATGATGTTGTTTTCTGTAATGCTATTTTGA
 TTTTATTTTGCAGGTGAACAAGAGCAACAGTGCTTTGATCCATATTACAAATGAGGGAT
 GGTACTATTTTATGGATGCAGTGAAACTTCTGAAAACATAGTTGGTGTGTTGCTCTTTGG
 AG

图2

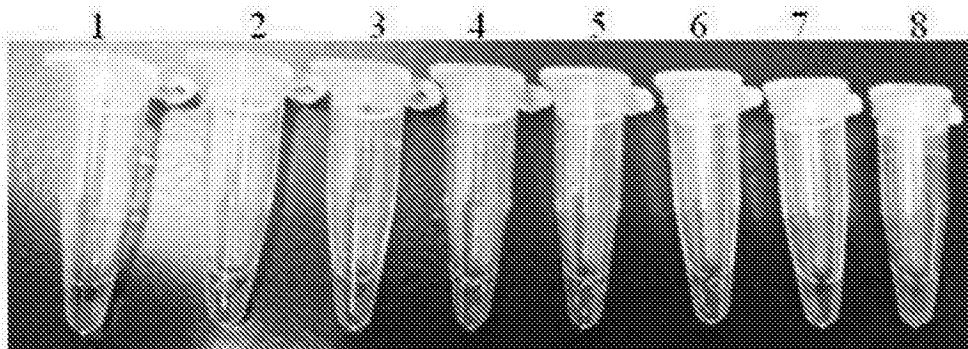


图3

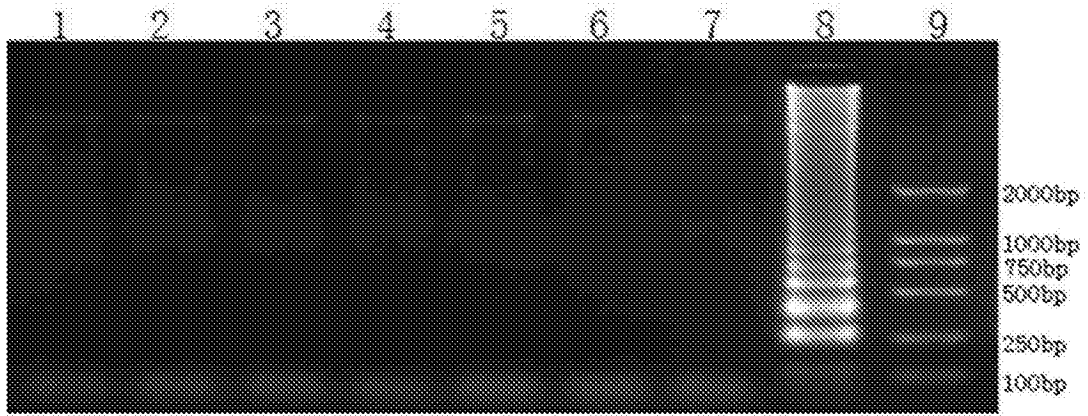


图4

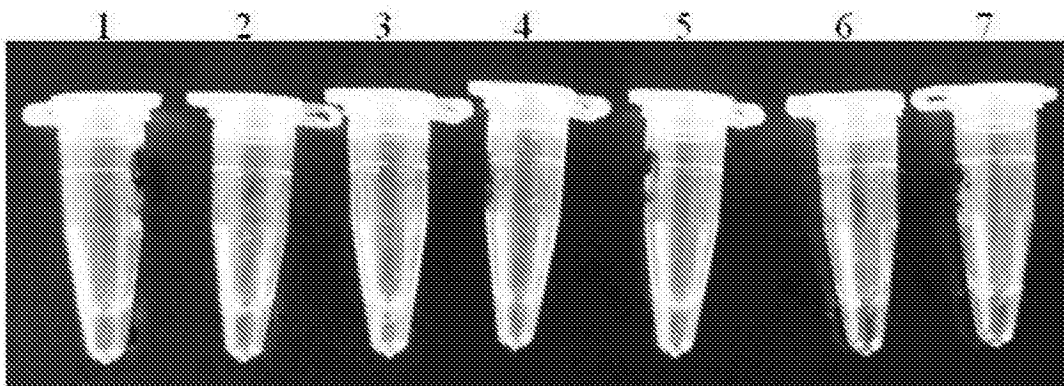


图5

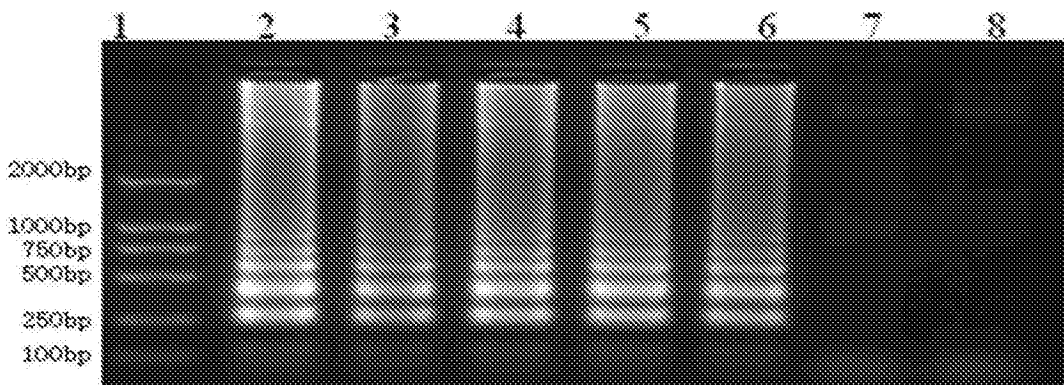


图6