



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105543360 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201610003483. X

(22) 申请日 2016. 01. 06

(71) 申请人 天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心

地址 300461 天津市滨海新区天津市天津港保税区京门大道 158 号

(72) 发明人 赵璟源 王仲敏 胡佳续 于尧 贺艳 张裕君

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于 Vip3A 基因检测的实时荧光检测方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明“一种用于 Vip3A 基因检测的实时荧光检测方法及其试剂盒”涉及转基因检测领域。通过设计针对 Vip3A 基因特异序列的特异引物,应用 PCR 扩增技术,实现了 Vip3A 基因的快速检测。该方法特异性强,灵敏度高和稳定性好,对于提高 Vip3A 基因检测的准确性、缩短检测时间具有重要的作用。

1. 一种用于Vip3A基因检测的特异性引物、探针,其特征在于,序列为:

上游引物 Vip3A-F: 5'—AACGACGACGGCGTCTACA—3'

下游引物 Vip3A -R: 5'—CTCGCGCAGGTAGCTCTTACA—3'

探针 Vip3A -P: 5' FAM—TGACCCCGATCAACGGCTTTGG—BHQ1 3'。

2. 一种用于检测Vip3A基因的试剂盒其特征在于,包括如下成分:

(1)阳性对照MIR162玉米DNA模板和阴性对照玉米DNA模板

(2)Vip3A基因上下游引物、探针

上游引物 Vip3A -F: 5'—AACGACGACGGCGTCTACA—3'

下游引物 Vip3A -R: 5'—CTCGCGCAGGTAGCTCTTACA—3'

探针 Vip3A -P: 5' FAM—TGACCCCGATCAACGGCTTTGG—BHQ13'

(3)10×Taq PCR Buffer ,ddH₂O,2.5mM dNTP ,5U/μl Taq酶。

3. 一种Vip3A基因的快速检测方法,包括如下步骤:

(1)PCR反应体系:

10×Ex Taq Buffer	2.5μl
dNTP(2.5mmol/L)	1μl
Vip3A -F(10μmol/L)	1μl
Vip3A -R(10μmol/L)	1μl
Vip3A -P(10μmol/L)	1μl
模板DNA	1μl
Ex Taq HS(5U/μL)	0.25μl
ddH ₂ O	17.25μl

25μl

(2)PCR反应条件: 95 °C 预变性 2 min,95 °C变性10s,60 °C退火30 s,40个循环,4 °C降温

(3)判定结果:若无Ct值或Ct值大于等于40,可以判定该样品中不含有Vip3A基因;若Ct值小于35,并且出现典型扩增曲线,可以判定该样品含有Vip3A基因;若Ct值介于35到40之间,并出现典型扩增曲线,则需要重新提取样品基因组DNA,再次进行实时荧光PCR检测,若检测结果Ct值仍小于40并出现典型扩增曲线,可判定该样品含有Vip3A基因。

一种用于Vip3A基因检测的实时荧光检测方法及其试剂盒

[0001] 摘要

本发明属于生物技术领域,涉及转基因植物及其产品的检测方法,具体涉及Vip3A实时荧光PCR检测引物、探针、方法及试剂盒。本方法首先公开了用于精准检测转基因玉米中Vip3A的特异性引物对和探针。在此基础上,本发明建立了一种特异性强、灵敏度高的Vip3A的实时荧光PCR检测方法。本发明进一步公开了一种Vip3A的实时荧光PCR检测试剂盒。实验证明,本发明提供的Vip3A实时荧光PCR检测引物、探针、方法及试剂盒具有特异性强、灵敏度高优点,适用于Vip3A的特异性精准检测。

技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,涉及转基因植物及其产品的检测方法,具体涉及转基因玉米中Vip3A的实时荧光PCR检测引物、探针、方法及试剂盒,适用于Vip3A的特异性精准检测。

背景技术

[0003] Vip3A是一种来自苏云金芽孢杆菌的抗鳞翅目昆虫蛋白基因。先正达公司将Vip3A转入玉米中,开发了转基因玉米MIR162品系。

[0004] 目前含有Vip3A基因的转基因玉米MIR162在美国、加拿大、阿根廷和巴西获得了种植批准,已经投入商业化生产。我国农业部已经批准MIR162转基因玉米用于加工原料。目前,已经有针对MIR162品系插入位点侧翼序列的检测方法,尚无针对Vip3A实时荧光PCR检测方法。

[0005] 本研究通过设计针对Vip3A的特异引物、探针,开发了实时荧光PCR检测方法及其试剂盒,实现了Vip3A的高效灵敏快速检测。

发明内容

[0006] 本发明需要解决的技术问题是提供用于检测Vip3A基因的特异性引物、探针

本发明需要解决的另一问题是提供包含上述引物、探针的PCR检测试剂盒。

[0007] 本发明用于检测Vip3A基因的PCR引物、探针序列为:

上游引物 Vip3A-F: 5'—AACGACGACGGCGTCTACA—3'

下游引物 Vip3A-R: 5'—CTCGCGCAGGTAGCTCTTACA—3'

探针 Vip3A-P: 5'FAM—TGACCCCGATCAACGGCTTTGG—BHQ1 3'

本发明的Vip3A基因检测试剂盒,包括以下成分:

(1)Vip3A玉米DNA模板和阴性对照玉米DNA模板

(2)Vip3A基因上下游引物、探针:

上游引物 Vip3A-F: 5'—AACGACGACGGCGTCTACA—3'

下游引物 Vip3A-R: 5'—CTCGCGCAGGTAGCTCTTACA—3'

探针 Vip3A-P: 5'FAM—TGACCCCGATCAACGGCTTTGG—BHQ1 3'

(3)10×Ex Taq Buffer,DDH₂O,2.5mM dNTP ,5U/μl Ex Taq HS

(4)判定结果:若无Ct值或Ct值大于等于40,可以判定该样品中不含有Vip3A基因;若Ct值小于35,并且出现典型扩增曲线,可以判定该样品含有Vip3A基因;若Ct值介于35到40之间,并出现典型扩增曲线,则需要重新提取样品基因组DNA,再次进行实时荧光PCR检测,若检测结果Ct值仍小于40并出现典型扩增曲线,可判定该样品含有Vip3A基因。

[0008] 与现有技术相比,本发明的进步在于:检测速度快,节省时间,特异性强,灵敏度高,稳定性好,适合口岸检疫实验室快速鉴定转基因玉米中Vip3A基因片段。

附图说明

[0009] 图1为Vip3A基因检测试剂盒特异性测试结果,1-8号为8个不同的转基因玉米品系,分别为MON89034、Bt11、Bt176、TC1507、MIR604、MON88017、MIR162、MON863,9号为非转基因玉米。从图1可以看出,含有Vip3A的7号样品MIR162玉米品系 Ct值小于35,并且出现典型扩增曲线,其他对照样品玉米均不含Vip3A基因,无扩增曲线,用本试剂盒能准确地检测出Vip3A基因。

具体实施方式

[0010] PCR引物、探针设计:

```

1 atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgcctgc cgagcttcat cgactacttc
61 aacggcatct acggcttcgc caccggcacc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc
121 gacaccggcg gcgacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac
181 atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgategc ccagggcaac
241 ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg
301 aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcgcgtgta cctgccgaag
361 atcaccagca tgctgagcga cgtgattaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag
421 tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc
481 ctgatcaaca gcaccctgac cgagatcacc ccggcctacc agcgcaccaa gtacgtgaac
541 gagaagttcg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc
601 agcccggccg acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc
661 aagaacgacg tggacggctt cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatggtgggc
721 aacaacctgt tcggccgcag cgccctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac
781 gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tctgatcgt gctgaccgcc
841 ctgcaggccc aggccttctt gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac
901 atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg
961 aacatcctgc cgaccctgag caacacette agcaaccga actacgcaa ggtgaagggc
1021 agcgacgagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggttc
1081 gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aaggtgtacg aggccaagct gaagcagaac
1141 taccaggtgg acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg
1201 tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtag
1261 gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacce tgcgctacga ggtgaccgcc

```


编号	作物	转基因品系	抗虫基因种类
1	玉米	MON89034	Cry1A.105、Cry2Ab2
2	玉米	Bt11	Cry1Ab
3	玉米	Bt176	Cry1Ab
4	玉米	TC1507	Cry1F
5	玉米	MIR604	Cry3A
6	玉米	MON88017	Cry3Bb1
7	玉米	MIR162	Vip3A
8	玉米	MON863	Cry3Bb1
9	玉米	非转基因	None

实施例1、Vip3A的检测

DNA提取:按照TIANamp Genomic DNA Kit组织基因组DNA提取试剂盒说明书进行操作,提取包括玉米MIR162等共9个样品的基因组DNA,溶于100uL TE中,-20℃保存备用。

[0011] 扩增:以无菌水作为空白对照,分别以9种玉米基因组DNA作为模板,进行PCR扩增。

[0012] PCR反应体系:

10×Ex Taq Buffer	2.5μl
dNTP(2.5mmol/L)	1μl
vip3A-F(10μmol/L)	1μl
vip3A-R(10μmol/L)	1μl
vip3A-P(10μmol/L)	1μl
模板DNA	1μl
Ex Taq HS(5U/μL)	0.25μl
ddH2O	17.25μl

25μl

PCR反应条件:95℃ 预变性 2 min,95℃变性10s,60℃退火30 s,40个循环,4℃降温。

[0013] 结果:

从图1可以看出,7号样品为含有Vip3A的MIR162玉米品系,Ct值小于35,并且出现典型扩增曲线,其他对照样品玉米均不含Vip3A基因,无扩增曲线。结果表明,本发明中的Vip3A特异引物、探针只能对Vip3A基因进行扩增,形成典型扩增曲线,其它阴性对照都没有出现扩增曲线,显示了该引物、探针良好的特异性。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110>	天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心	
<120>	一种用于Vip3A基因检测的实时荧光检测方法及其试剂盒	
<141>	2016-01-04	
<160>	3	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	aacgacgacg gcgctctaca	19
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	ctcgcgcagg tagctcttac a	21
<210>	3	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	tgacccccgat caacggcttt gg	22

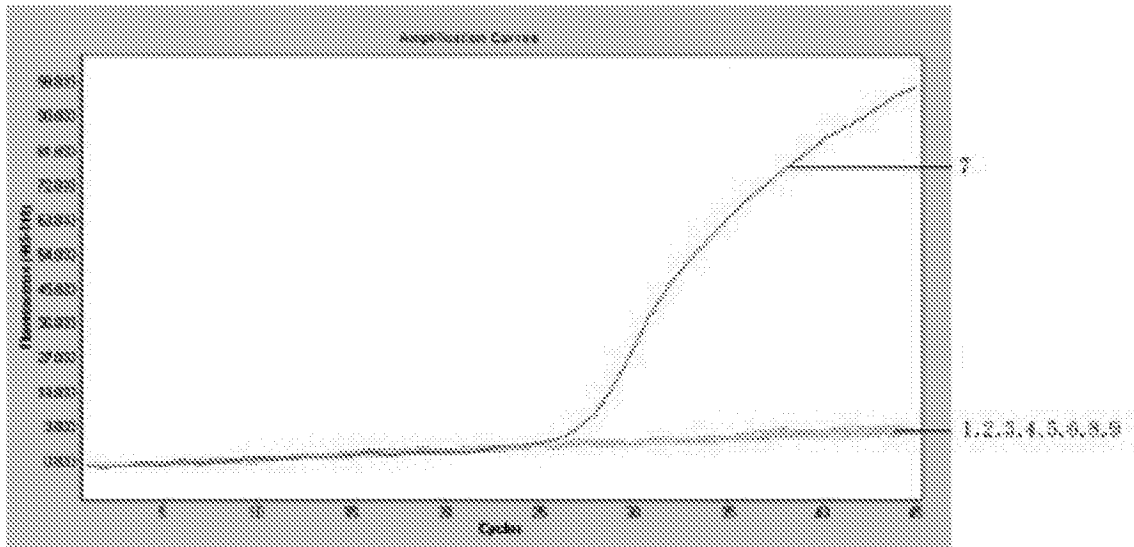


图1