

转基因植物 CamV35S 启动子核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【产品名称】

通用名称: 转基因植物 CamV35S 启动子核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

Name: CamV35S Gene Detection Kit (Real-Time PCR Method)

【包装规格】 25T/盒、50T/盒

【预期用途】

自世界上第一例转基因作物问世以来, 转基因作物迅猛发展。转基因作物在抗虫、抗病、抗逆、高产、优质等方面取得了一定成就, 特别是与人密切相关的转基因食品。为保护贸易、明确消费, 各国政府均对安全监管提出了更高的要求。花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CamV35S) 是转基因作物中最经常用到的 2 个元件之一, 到目前为止, 62% 授权商业化种植的转基因作物中含有 CamV35S。荧光 PCR 技术因其灵敏度高、特异性强等特点, 在转基因检测中发挥了重要作用。

本试剂盒适用于检测转基因植物的 CamV35S 基因, 用于筛查待检测植物中是否含有 CamV35S 成分。

【检验原理】

本试剂盒采用 TaqMan 探针法实时荧光 PCR 技术, 设计一对 CamV35S 启动子序列特异性引物, 结合一条特异性探针, 用荧光 PCR 技术对 CamV35S 启动子序列的 DNA 进行体外扩增检测, 从而达到快速检测之目的。

【试剂组成】

包装规格	25T/盒	50T/盒
CamV35S 反应液	500 μ L \times 1 管	500 μ L \times 2 管
酶液	25 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CamV35S 阳性质控品	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
阴性质控品	250 μ L \times 1 管	250 μ L \times 1 管
CamV35S 阳性标准品 (1.04 \times 10 ⁷ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CamV35S 阳性标准品 (1.04 \times 10 ⁶ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CamV35S 阳性标准品 (1.04 \times 10 ⁵ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
CamV35S 阳性标准品 (1.04 \times 10 ⁴ copies/mL)	50 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管

说明: 不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【储存条件及有效期】

-20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C, 避光保存、运输、反复冻融次数不超过 5 次, 有效期 12 个月。

【适用仪器】

ABI、安捷伦 MX3000P/3005P、LightCycler、Bio-Rad、Eppendorf 等系列荧光定量 PCR 检测仪。

【标本采集】

称取 200g 样品。

【保存和运输】

上述标本短期内可保存于 -20 $^{\circ}$ C, 长期保存可置 -70 $^{\circ}$ C, 但不能超过 6 个月, 标本运送应采用 2~8 $^{\circ}$ C 冰袋运输, 严禁反复冻融。

【使用方法】

1. 样品处理 (样本处理区)

1.1 样本前处理

固体样本: 用粉碎机或冷冻研磨仪将样品研磨至细粉状。

1.2 核酸提取

推荐采用上海将来实业股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (磁珠法或离心柱法) 进行核酸提取, 请按照试剂说明书进行操作。

2. 试剂配制 (试剂准备区)

根据待检测样本总数, 设所需要的 PCR 反应管数为 N (N = 样本数 + 1 管阴性对照 + 1 管阳性对照; 样品每满 10 份, 多配制 1 份), 每测试反应体系配制如下表:

试剂	CamV35S 反应液	酶液
用量 (样本数为 N)	20 μ L	1 μ L

将混合好的测试反应液分装到 PCR 反应管中, 21 μ L/管。

3. 加样 (样本处理区)

将步骤 1 提取的核酸、阳性质控品、阴性质控品各取 4 μ L, 分别加入相应的反应管中, 盖好管盖, 混匀, 短暂离心。

4. PCR 扩增 (核酸扩增区)

4.1 将待检测反应管置于荧光定量 PCR 仪反应槽内；

4.2 设置好通道、样品信息，反应体系设置为 25 μ L；

荧光通道选择：检测通道（Reporter Dye）FAM，淬灭通道（Quencher Dye）NONE，ABI 系列仪器请勿选择 ROX 参比荧光，选择 None 即可。

4.3 推荐循环参数设置：

步骤	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1 cycle	95 $^{\circ}$ C	10min	否
2	40 cycles	94 $^{\circ}$ C	15sec	否
		55 $^{\circ}$ C	30sec	是

5. 结果分析判定

5.1 结果分析条件设定

设置 Baseline 和 Threshold：一般直接按机器自动分析的结果分析，当曲线出现整体倾斜时，根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值（一般可在 3~15 范围内调节）、stop 值（一般可在 5~20 范围内调节），以及 Threshold 的 Value 值（上下拖动阈值线至高于阴性对照），重新分析结果。

5.2 质控标准

5.2.1 阴性质控品：用作阴性质控。FAM 通道无 S 型曲线，在 Reports 界面 Ct 一栏显示 Undet.；

5.2.2 阳性质控品：扩增曲线有明显指数生长期，且 Ct 值 \leq 32；以上条件应同时满足，否则实验视为无效。

5.2.3 阳性标准品：用作标准曲线的绘制。FAM 通道有 S 型曲线，标准品线性相关系数 $|R|(r) \geq 0.98$ 。

以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

6. 检验结果的解释

在满足质量控制的条件下，待检样本检测结果 Ct 值为“Undet”或核酸含量显示 $<1 \times 10^3$ copies/mL，报告“低于试剂盒最低检测限(1×10^3 copies/mL)”；核酸含量在 1×10^3 copies/mL~ 1×10^8 copies/mL 之间的样本，直接报告测定数值；核酸含量高于 1×10^8 copies/mL 的样本，建议用 1 \times TE 稀释后重新测定，结果根据稀释倍数进行校准，报告校准后的值，并注明“可报告浓度”。

7. 检测方法的局限性

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送以及保存质量有关；
2. 样本提取过程中没有控制好交叉污染，会出现假阳性结果；
3. 阳性对照、扩增产物泄漏，会导致假阳性结果；
4. 病原体在流行过程中基因突变、重组，会导致假阴性结果；
5. 不同的提取方法存在提取效率差异，会导致假阴性结果；
6. 试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，出现假阴性或定量检测不准确的结果；
7. 本检测结果仅供参考，如须确诊请结合临床症状以及其他检测手段。

【注意事项】

1. 所有操作严格按照说明书进行；
2. 试剂盒内各种组分使用前应自然融化，完全混匀并短暂离心；
3. 反应液应避免光保存；
4. 反应中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧；
5. 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服；
6. 样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行，以免交叉污染；
7. 实验完毕后用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器；
8. 试剂盒内所有物品应视为污染物对待，并按照《微生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

【参考文献】

- [1] 中国农业部. 1782 号公告-3-2012 转基因植物及其产品成分检测调控元件 CamV 35S 启动子、FMV 35S 启动子、NOS 启动子、NOS 终止子和 CaMV 35S 终止子定性 PCR 方法[S]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [2] 徐俊锋, 王鹏飞, 李玥莹, 等. 转基因植物中 CaMV35S 和 tNOS 元件的 4 种定性 PCR 检测方法的比较. 农业生物技术学报, 2015, 23 (3) :397-407.