



文件编号: BW-JS-GMO-B002

仅限体外使用

foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒（冻干粉）
(P-35S, T-NOS, P-FMV)
– 5′核酸酶 –

第一版, 2015 年 3 月

用于使用实时 PCR 设备定性检测转基因植物 P-35S, T-NOS 和 P-FMV 序列的 PCR 试剂盒。

货号 **R 602 17-1 / R 602 17-2**
该试剂盒为 96 个反应设计 (冻干粉), 最多可检测 94 个样品。
于 2 到 8 °C 储存

1. 产品用途
样品量

该试剂盒为 96 个反应设计, 最终反应体积为 25 µl, 最多可检测 94 个样品加上阴性对照和阳性对照。

储存及稳定性

- 试剂盒必须在标签标示的保质期前于 2 °C 到 8 °C 保存。
- 该试剂盒一旦打开, 按照下述试剂盒成分表的指示来保存试剂盒内试剂。

试剂盒成分

成分	标签	内容 / 功能 / 储存
foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒 (冻干 粉) 微孔板, 预填装了 96 个反应	铝袋里有 8 联排管 • R 602 17-1 白色的矮 管 * • R 602 17-2 无色的普 通管*	• 96 个预填装的反应 (冻干粉)。 • 即时可用的引物及 5′ 核酸酶探针混合物, 包括花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子、农杆菌 (NOS 终止子) 的胭脂碱合酶基因的 3′ 非转译区以及玄参花叶病毒的 FMV 启动子, 和内部对照 (IC)、Taq DNA 聚合酶、尿嘧啶-DNA-糖基化酶 (UNG, 热不稳定) 用于防止残留物污染。. • 用于扩增和检测 P-35S, T-NOS, P-FMV 和内部对照 (IC) 序列。 • 在铝袋中 2 °C 到 8 °C 储存 (密封)。 • 避免阳光和潮湿!

对照模板	2 号瓶（紫帽）	• 1 x 250 µl • 包含稳定的 DNA. • 用于 PCR 反应的阳性对照. • 存储于 2 到 8 °C.
水 PCR 级	3 号瓶（无色帽）	• 2 x 1 ml • 无核酸酶, PCR 级水。. • 用于 PCR 反应的阴性对照。
8 联排帽	塑料袋包装的 8 联排帽	• 12 x 8-帽 条 • 用于加入样品后盖帽。.

*矮管和普通管适用机型请参照: www.bc-diagnostics.com/compatibility-chart

所需的附加仪器及试剂

- 能够检测 FAM、VIC/HEX、ROX 及 Cy5 标记探针的实时荧光定量 PCR 仪。
- 样品制备试剂盒
foodproof®样品制备试剂盒 III (货号: S 400 06.1) 或
foodproof® 磁力准备试剂盒 III (货号: S 400 13)。

适用性说明

foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒（冻干粉）用于检测转基因成分，对 3 个嵌入的基本序列（P-35S, T-NOS 和 P-FMV）中的一种或多种进行快速检测。同样可以检测食品、原材料、饲料及种子样本。该试剂盒不得应用于诊断过程。

该操作手册所介绍的试剂盒经过优化，适用于带有 FAM, VIC/HEX, ROX 以及 Cy5 检测通道的实时荧光定量 PCR 设备。该试剂盒的表现通过了以下实时 PCR 设备的测试: LightCycler® 480, LightCycler® 96 (Roche Diagnostics), Mx3005P® (Agilent Technologies), ABI 7500 FAST (Applied Biosystems), AriaMx® (Agilent Technologies), 和 PikoReal® 24 (Thermo Scientific)。

备注: 若使用 LC480 系统 I 和 II 检测，进行颜色补偿（颜色补偿 3*，货号: A 500 10）是必要的，可由石家庄博维生物科技有限公司提供。

2. 如何使用该产品

2.1 在开始前

注意事项

使用 foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒（冻干粉）需要通过 PCR 进行 DNA 扩增来检测转基因 DNA。该试剂盒能够提供所有 PCR 需要的试剂。然而，为了获得可靠的结果，整个分析过程必须在无核酸酶的条件下进行。请按照以下指示进行操作，免除核酸酶污染、残留污染以及交叉污染：

- 将试剂盒与其它试剂分开储存。
- 使用无核酸酶的实验室器材进行试验（例如移液器、枪头、反应管等）。
- 实验时穿戴手套。
- 为了防止样品和试剂的交叉污染，应使用新的防气溶胶移液器枪头。
- 为了防止残留污染，将一次实验所需的溶液移入一个新的试管中，而不是直接从存放的试剂瓶中用移液器吸取。

• 为进行 DNA 提取、PCR 建立和 PCR 运行，应对实验室进行分隔，来减小残留污染。在所有移液步骤中使用 PCR 罩。

foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒（冻干粉）中的 PCR 混合物应避免阳光和潮湿。

样品材料

为了保证 DNA 提取的纯度、浓缩效果，避免抑制剂，请使用适用于 PCR 的样本材料。为了从生食品原材料或食物富集物中制备基因组 DNA，请参考适宜的样品制备试剂盒产品说明书介绍。（参见“所需的附加仪器及试剂”介绍）

DNA 提取

石家庄博维生物科技有限公司提供针对原材料、食物样品的样品制备试剂盒。（参见“所需的附加仪器及试剂”介绍）。

阳性对照

每次检测样本时都要设置一个阳性对照，用试剂盒提供的对照 DNA（2 号瓶，紫帽）代替模板 DNA，就设置好了一个阳性对照。

阴性对照

每次检测样本时都要设置一个阴性对照，用 PCR 级水（3 号瓶，无色帽）代替模板 DNA，就设置好了一个阴性对照。另外建议在样品制备过程中加入一个阴性对照，来监控反应的纯净度以及是否有交叉污染。该提取对照可用作一个附加的阴性对照反应。

2.2 操作步骤

程序设定

在制备反应混合液前设置 PCR 设备的程序，设置好以下温度-时间的程序，就可以进行扩增（关于如何设置程序，请参考您的实时荧光定量 PCR 仪的操作手册）。以下程序分别针对不同的 PCR 仪：

对于 Roche LightCycler® 480, LightCycler® 96, AriaMx® 和 ABI 7500 FAST:		对于其它实时荧光定量 PCR 仪:	
预温浴	循环数: 1	预温浴	循环数: 1
第 1 步:	37 °C, 4 min	第 1 步:	37 °C, 4 min
第 2 步:	95 °C, 10 min	第 2 步:	95 °C, 10 min
扩增	循环数: 50	扩增	循环数: 50
第 1 步:	95 °C, 5 s	第 1 步:	95 °C, 15 s
第 2 步*:	60 °C, 60 s	第 2 步*:	60 °C, 60 s

* 第 2 步进行荧光信号检测

Notes:

- 对于某些实时荧光定量 PCR 仪，必须设置淬灭探针类型以及参比荧光染料。foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒所含有的探针为非荧光（暗）淬灭探针并且不含有参比荧光染料。
- 对 Agilent Mx3005P 的用户，点击“Instrument”下的“Filter Set Gain Settings”打开 Filter Set Gain Settings 对话框，来查看设置并进行更改。对于 FAM 通道，Filter Set Gain Settings 应被设置为“x1”

PCR 混合液的制备

准备一份用于一个标准反应的 25μL 体系请按下列说明进行。在操作 PCR 8 联排管和帽时要戴手套，冻干粉只有在铝袋内的硅胶板中有效。

1. 将所需数量的 PCR 管从铝袋中取出，之后封好口。
2. 将 PCR 管放到合适的 PCR 管架上，检查反应的颗粒是否在底部，如不在，请短暂离心或轻弹管壁。
3. 小心打开管帽。

备注: 不要将联排管打开时间过长而不添加液体。

1. 吸取 25 μl 样品到每一个 PCR 管中，缓慢上下吸打。
 - 对于待测样品, 添加 25 μl 样品 DNA (如不够, 添加 PCR 级水至 25 μl)。
 - 对于阴性对照, 添加 25 μl PCR 级水 (3 号瓶, 无色帽)。
 - 对于阳性对照, 添加 25 μl foodproof® GMO 筛查 1 号试剂盒（冻干粉）中的对照模板 (2 号瓶, 紫帽)。

2. 用无色盖子封口。
- 备注: 或者在封口后充分混匀，避免交叉污染。
3. 短暂离心。

4. 放入 PCR 仪。
- 备注: 对于使用 LightCycler 480 的用户，需要专门的适配器（货号：Z 100 24）。在 PCR 仪内，PCR 管需要对称放置，比如放第 1 列和第 12 列。

2.3 分析

转基因目标片段的 DNA 扩增在 FAM (35S 启动子)、HEX (T-NOS)、ROX (P-FMV) 以及 Cy5 (内部对照) 标记探针的荧光通道里进行分析。比较不同通道的结果，按下表进行分析。

FAM 通道 (P-35S)	HEX 通道 (T-NOS)	ROX 通道 (P-FMV)	Cy5 通道 (内部对照)	结果分析
阳性	阳性	阳性	阳性或阴性	P-35S, T-NOS 和 PFMV 阳性
阴性	阳性	阳性	阳性或阴性	T-NOS 和 P-FMV 阳性
阳性	阴性	阳性	阳性或阴性	P-35S 和 P-FMV 阳性
阳性	阳性	阴性	阳性或阴性	P-35S 和 T-NOS 阳性

阴性	阳性	阴性	阳性或阴性	T-NOS 阳性
阳性	阴性	阴性	阳性或阴性	P-35S 阳性
阴性	阴性	阳性	阳性或阴性	P-FMV 阳性
阴性	阴性	阴性	阳性	P-35S, T-NOS 和 P-FMV 阴性
阴性	阴性	阴性	阴性	无效的结果

备注: 对 P-35S、T-NOS、P-FMV 基因和内部对照进行准确检测的先决条件是对 FAM, HEX, ROX 和 Cy5 通道进行校正。请联系 PCR 仪器生产商了解更多信息。

3. 常见问题

现象	可能的原因	建议解决方案
没有观察到增长信号，即使阳性对照也没有	选择了错误的检测通道	• 将通道切换到 FAM, HEX, ROX 和 Cy5.
	移液操作错误或遗漏了试剂	• 检查操作步骤，重新开始 PCR。 • 每次检测都要设置阳性对照。
	没有设置检测步骤	• 检查程序设置
在 Cy5 通道没有信号增长	样品材料的抑制作用（例如不充足的纯化）。	• 使用推荐的 DNA 样品制备试剂盒。 • 稀释样品或吸取更少量体积的样品（例如 5 µl 而不是 25 µl）。
荧光强度过低	不适当的储存试剂盒	• 将试剂盒储存在 2 °C 到 8 °C，在干燥处避光储存。.
	初始样品 DNA 含量过低.	• 增加样品 DNA 的含量。不同的 DNA 提取方法可能会出现抑制作用。
荧光基线明显下降	冻干粉 PCR 混合液没有混合均匀	• 充分混合冻干粉 PCR 混合液
阴性对照样本显阳性	残留污染	• 替换所有关键的试剂。 • 利用新的试剂重新进行整个实验。 • 保证以良好的操作规范进行样本、监测系统试剂以及耗材的操作，以避免 • 残留污染。 • 在密封好样品和阴性对照之后再加入阳性对照。
荧光强度异常	PCR 管离心不彻底 制备的 PCR 混合液仍在反应管的上层	总是按照要求对离心管进行离心。
	反应管的外表面不干净或外盖不干净（例如因皮肤直接触摸而	操作反应管或进行密封时必须穿戴手套。

	污染)	
冻干粉不能溶解	冻干粉再水化	• 将冻干粉在铝袋内的硅胶板上保存。 • 打开管帽后立即添加液体。

参考文献

1. International Organization of Standardization. ISO 21569:2013, Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods, 2013-08
2. Official Compendium of Analytical Methods according to § 64 LFGB (Food and Feed law), Food analysis, Detection of a DNA sequence of the FMV-promoter (pFMV) in foodstuffs using real-time PCR, BVL L 00.00-148, 2014, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln
3. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC