



农作物种子转基因成分检测



- 一、转基因充分筛查元件的一般结构

- 1、转基因通用元件筛选PCR检测

- 筛选是通过对CaMV35S启动子、NOS终止子、以及NptII 标记基因等通用元件进行的检测，初步评估所检样品是否含有转基因成分。

- 2、目的基因特异性PCR检测

- 以检测插入外源基因的特异性DNA片段作为检测手段,对如cry1Ab、cry1Ac或CP4-EPSPS等抗虫、耐除草剂等目的基因的检测，评估所检样品是否含有外源基因及种类。

- 3、构建特异性PCR检测

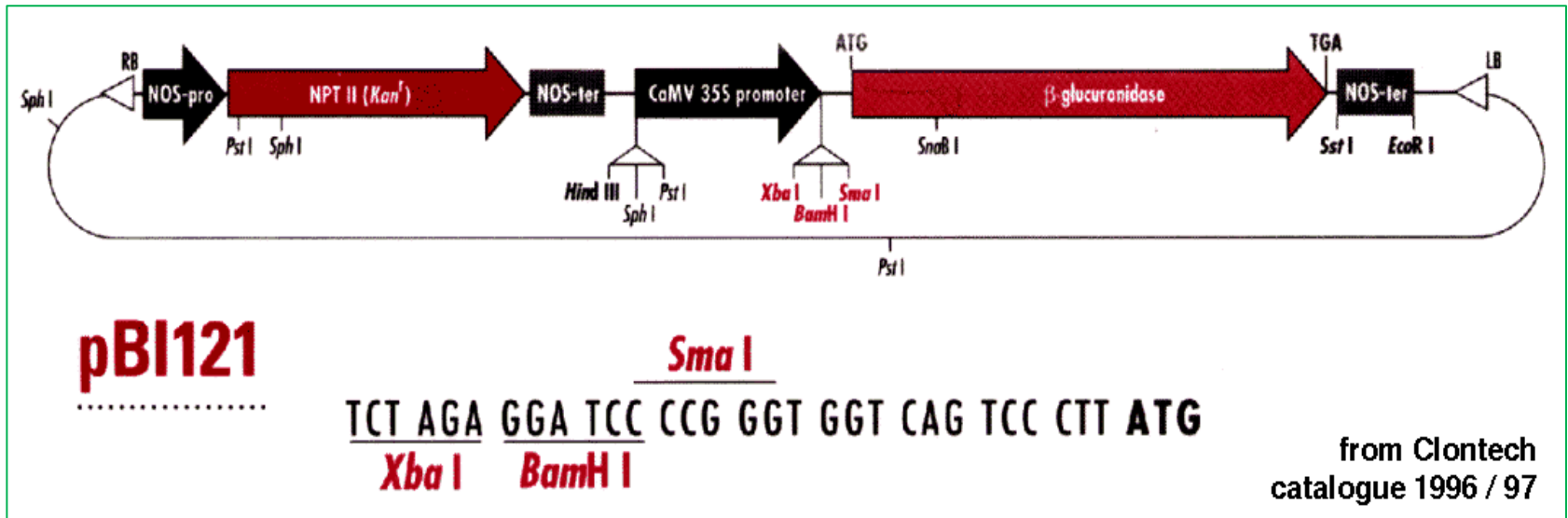
- 用于转基因作物结构基因特异性PCR检测，检测外源插入载体中两个元件的连接区的DNA序列。



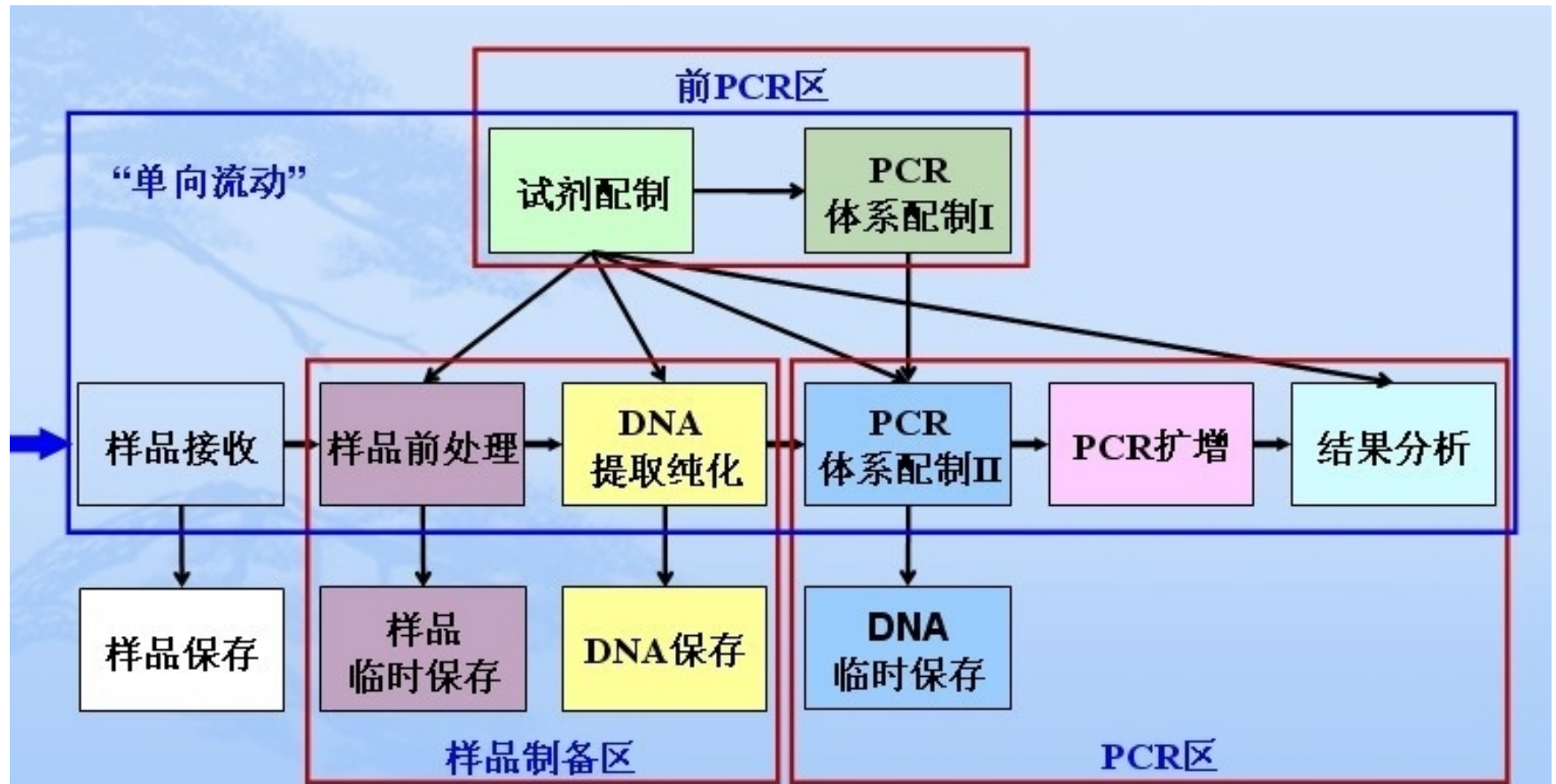
• 一、转基因充分筛查元件的一般结构

4、转化体特异性PCR检测方法

用于转基因作物转化体特异性检测,检测外源插入载体与植物基因组的连接区域,此外,物种特异性检测可用于评估所检作物的DNA提取质量,是否存在足够的DNA进行转基因成分分析。



二、GMO实验室建造及格局



《农业转基因生物安全监督检验检疫测试机构基本条件》

(农市发〔2006〕19号文件)



• 三、转基因筛查的一般方法

1、生物表现型检测方法

2、特异蛋白质检测方法

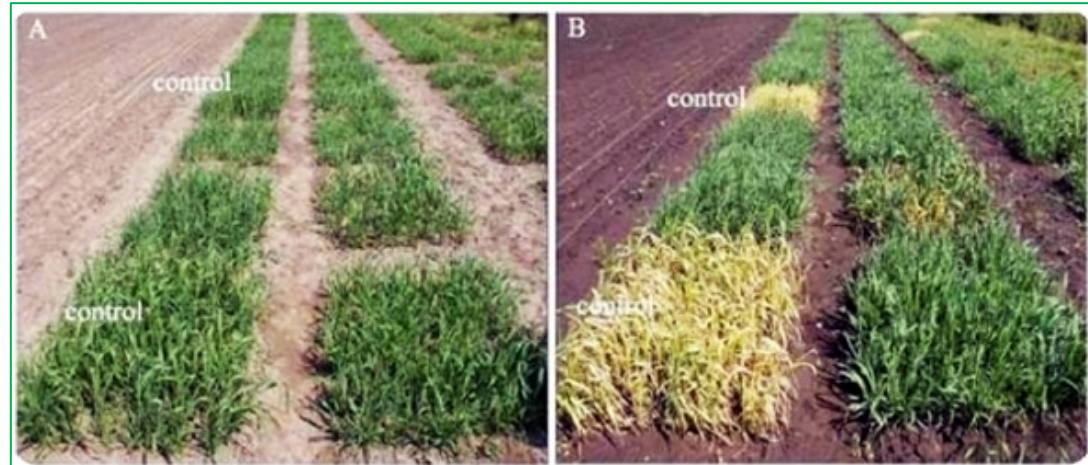
酶联免疫检测

横向测流条测定

3、DNA检测方法

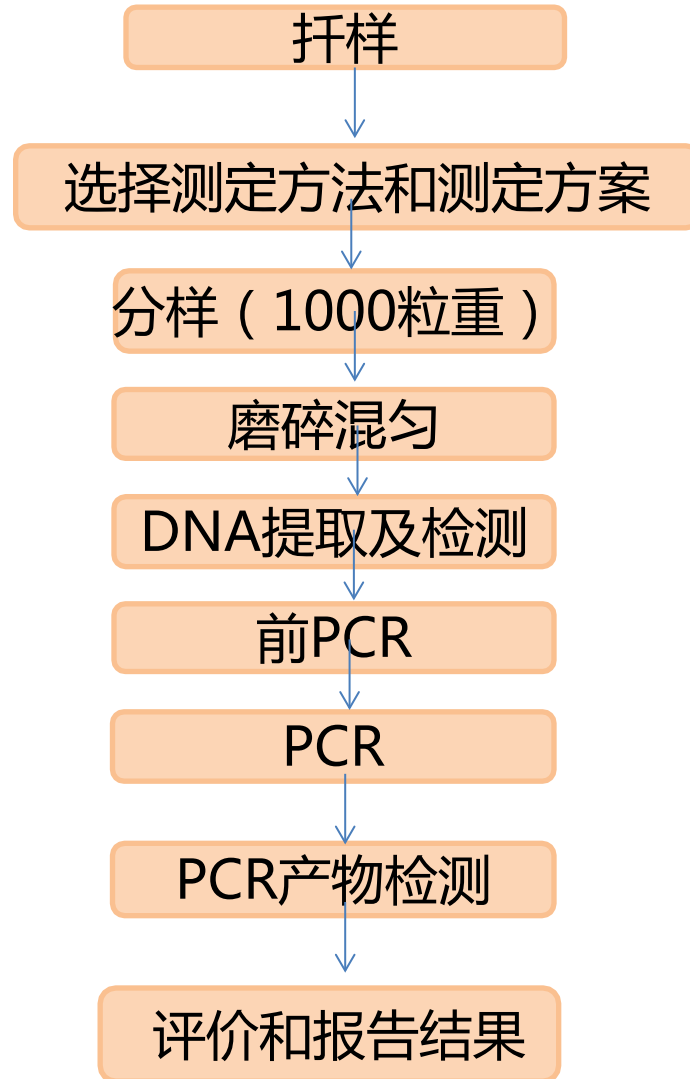
定性PCR检测技术

定量PCR检测技术





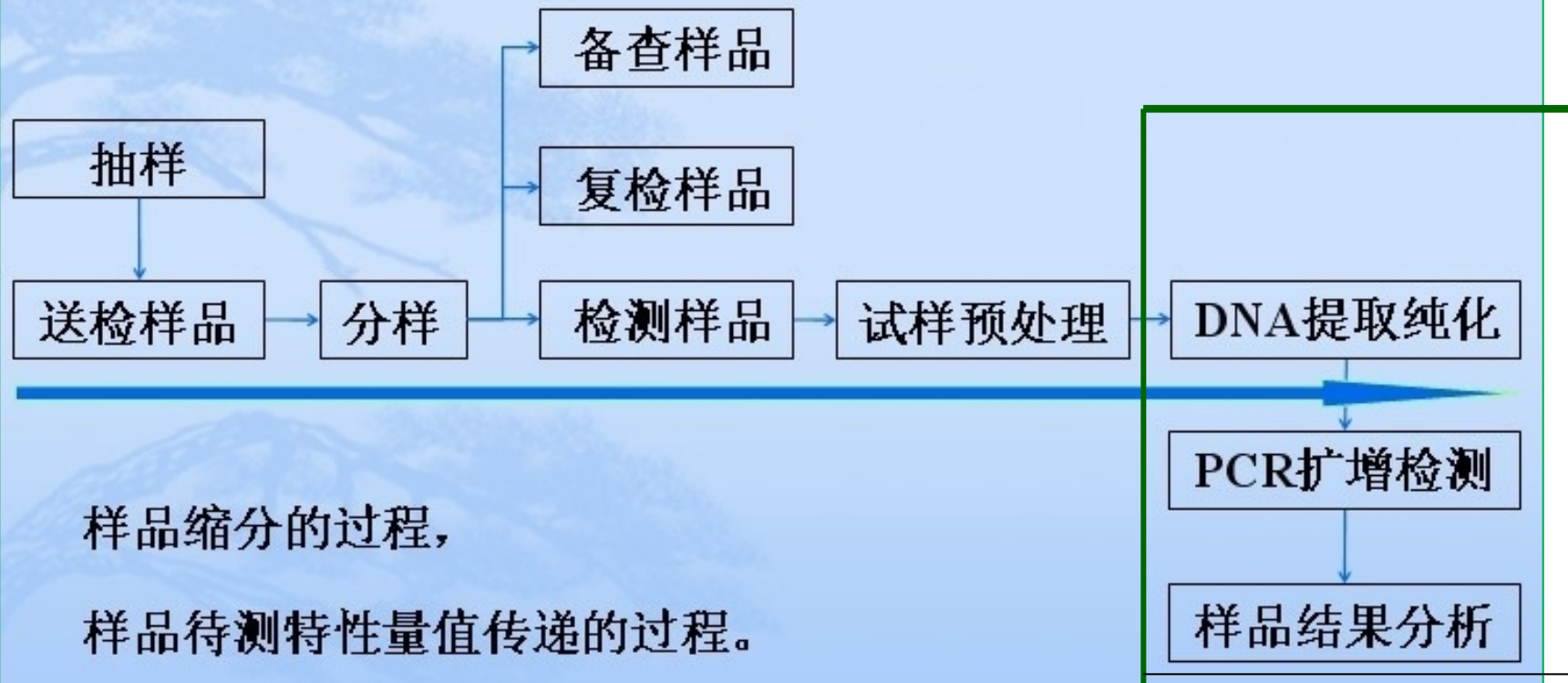
四、检测流程





四、检测流程

转基因产品检测一般流程





四、检测流程

1、样品接收与制样

(1) 样品接收

主要依据 **NY/T 672-2003** 《转基因植物及其产品检测-通用要求》，**NY/T 673-2003** 《转基因植物及其产品检测 - 抽样》

(2) 样品代表性

(3) 分样方法

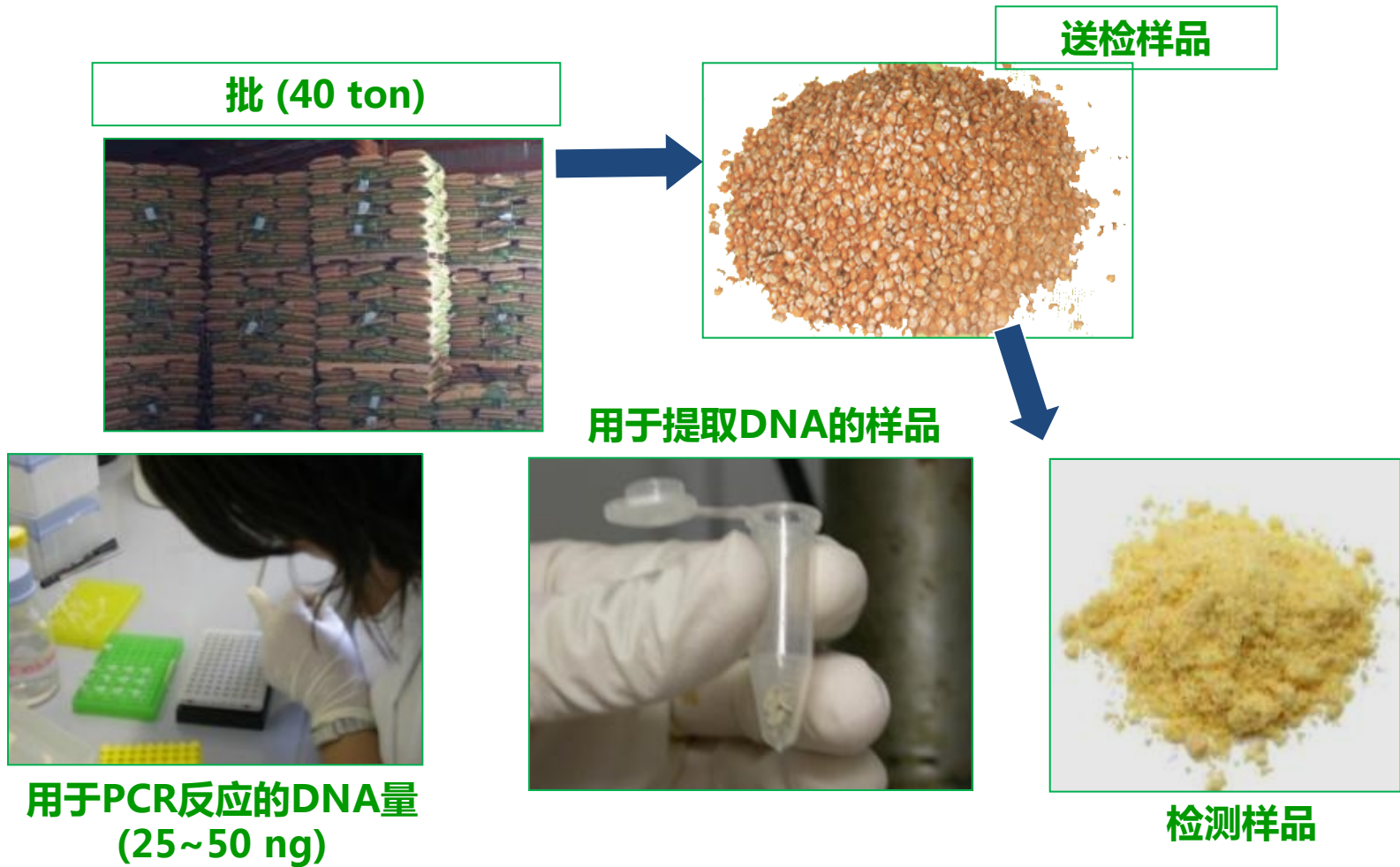
(4) 样品保存





四、检测流程

1、样品接收与制样





四、检测流程

2、DNA提取与纯化

DNA提取方法的选择，应基于以下考虑

- (1) 物种 (玉米、大豆、水稻、棉花等)
- (2) 状态 (组织、叶片、种子、加工产品等)
- (3) 目标DNA (核DNA、质体DNA)
- (4) 用途 (PCR、克隆、标记、杂交等)



四、检测流程

DNA制备的基本原则：

- (1) 保证提取的DNA具有一定的长度
- (2) 纯化后不应存在对酶有抑制作用的物质
- (3) 排除有机溶剂和金属离子的污染
- (4) 蛋白质、多糖、脂类等降低到最低程度
- (5) 去除其他核酸分子 (RNA) 的污染



• 四、检测流程

注意事项：

- (1) 尽量简化操作步骤
- (2) 减少化学因素对DNA的降解
- (3) 减少物理因素对DNA的降解
- (4) 防止核酸的生物降解
- (5) 设置阴性提取对照

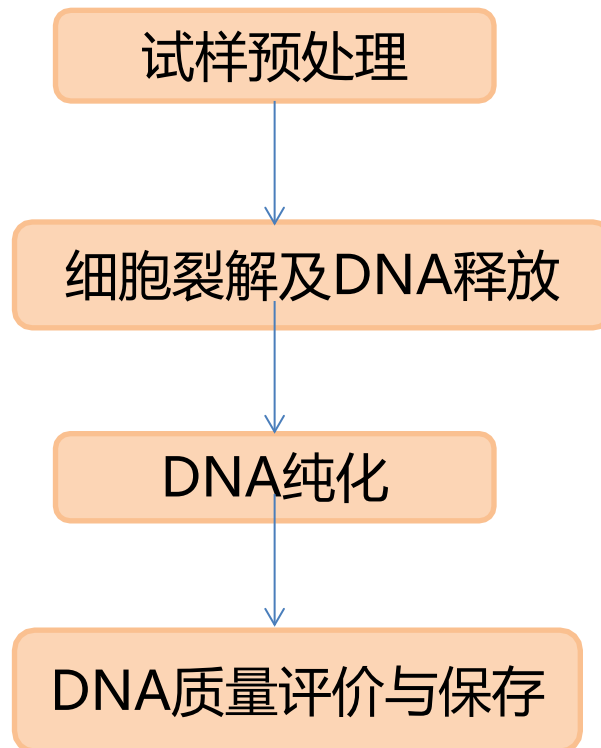
提取方法：苯酚-氯仿法、SDS法、CTAB法、二氧化硅法、试剂

盒法

- 四、检测流程



基本步骤包括





• 四、检测流程

软件：

- (1) 专用实验服、一次性手套；
- (2) 使用本区专用的仪器设备；
- (3) 周期性清洁通风系统；
- (4) 在防止粉尘扩散的设施中研磨样品。

研磨顺序：

阴性对照 试样 阳性对照。

- (1) 勤用漂水清洗研磨设备和工作台面。
- (2) 每处理完一个样品，要彻底清洗研磨器具、清洁工作台面后，再处理下一个样品。（可适当多配置一些研磨器具）



• 四、检测流程

研磨器具的清洗流程：

清水、洗涤液、清水、漂水、灭菌水。

离心管等耗材在使用前应高压灭菌。

避免在样品前处理区加裂解液。

新鲜或冷冻材料在液氮中研磨要迅速，在液氮彻底挥发前转移至冰或干冰中， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用；可分装后保存。

实验结束后打开紫外灯灭菌。

每个样品取2份相同的测试样进行DNA提取和纯化。



• 四、检测流程

样品研磨机粉碎

1 g-10 g



10 g-50 g



10 g-600 g





• 四、检测流程



GOOD-USE BIO

Broad Base Bio

FastTesting™ Plant genomic DNA extraction Kit

Cat# DE011

Kit Components

Component	Amount	
	50T	100T
Buffer A	15ml	30ml
Buffer B	5ml	10ml
Buffer BC	10ml	20ml
Buffer C	6.25ml	12.5ml
Buffer D	10ml	20ml
Spin column	50	100
Handbook	1 copy	1 copy

Important notes

1. Please add 21ml absolute ethanol to Buffer A and mix thoroughly before the first use.
2. Please operate in clean condition; All reagents should not be opened in the air for a long time.
3. All reagents, when stored at 15-25°C properly, are stable for 180 days.

快检试剂盒法种子DNA提取

Protocol

1. Transfer up to 100mg tissue powder to a 1.5ml microcentrifuge tube.
2. Add 300ul A Buffer and 100 ul B Buffer, vortex gently for 5-10 minutes. If the sample is difficult to be lysised, please extend the incubation time.
3. Centrifuge for 3-5 minutes at 12,000 xg.
4. Transfer 200uL supernatant to a new 1.5ml tube, add 200uL BC buffer, incubate for 2 minutes.
5. Transfer the mixture to Spin Column, then centrifuge at 10,000 x g for 30 second. Discard flow-through.
6. Add 500µl C Buffer to the spin column. Centrifuge at 10,000 xg for 30 seconds. Discard flow-through.
7. Drying the spin for 5-10 minutes in a new 1.5ml tube.
8. Add 200ul TE buffer, Incubate for 2 minute, then centrifuge for 1 minute at 10,000 xg. The buffer in the tube contains the DNA.
9. The purified DNA can be used directly for kinds of downstream molecular biological experiments. Store at -20°C if not used immediately.



GOOD-USE BIO

For testing and research use only



• 一、田间检验

DNA质量评价

□ 琼脂糖凝胶电泳测定法

□ 紫外分光光度计测定法

DNA纯度：纯的DNA其 $OD_{260}/OD_{280}=1.8\pm 0.1$ ，
 $OD_{260}/OD_{230} > 2.0$ 。

—若 $OD_{260}/OD_{280} > 1.9$ ，含有RNA杂质， < 1.6 ，含有蛋白质或酚等污染。

—若 $OD_{260}/OD_{230} < 2.0$ ，表明溶液中残存盐或小分子杂质。

—一般将DNA浓度调整为 $20 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

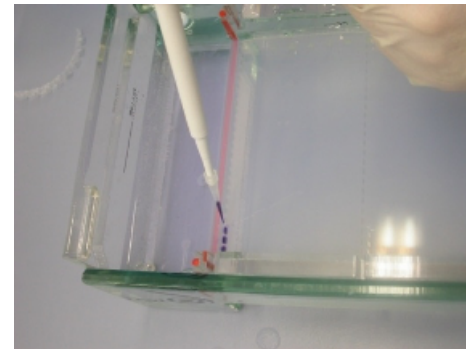
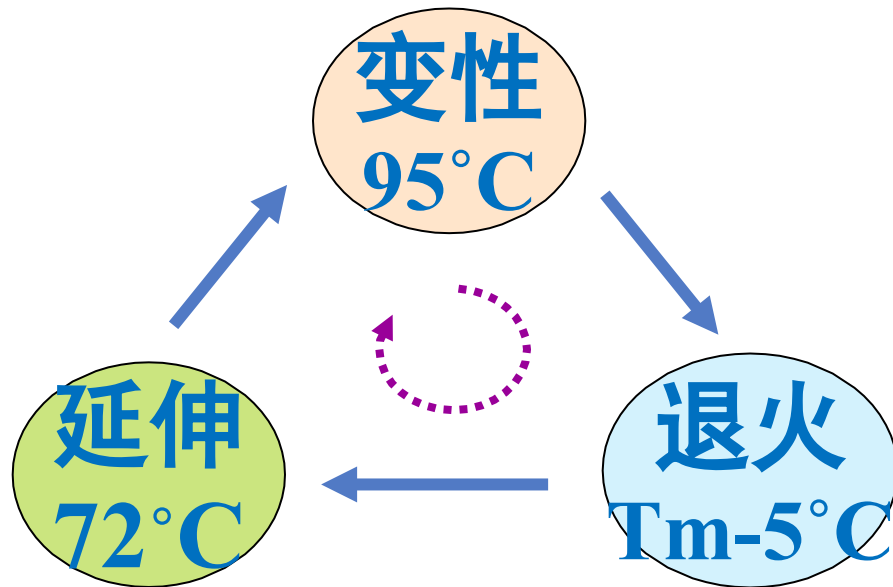
荧光定量测定法

□ 内标准基因的PCR扩增

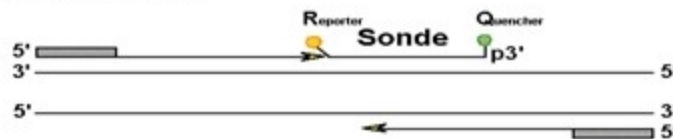


- 五、PCR反应

PCR 的基本反应步骤



Polymerisation



转基因PCR检测3-4 小时

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/587022030153006111>