

Контрольный

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

В.И. Качан

2009 г.

Регистрационный № 067-1109



**МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ОРГАНИЗМОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр гигиены»

Авторы: В.П. Филонов, И.А. Застенская, Е.В. Федоренко,

Л.А. Мельникова, Т.С. Трешкова

Минск-2009



ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Методы идентификации и количественного определения генно-инженерных модифицированных организмов растительного происхождения» (далее - Инструкция) устанавливает методы идентификации и количественного определения генетически модифицированных организмов (далее - ГМО) растительного происхождения в продовольственном сырье и пищевых продуктах.

2. Инструкция предназначена для применения в лабораториях учреждений санитарно-эпидемиологической службы, осуществляющих контроль за качеством продовольственного сырья и пищевых продуктов, в т.ч. импортируемых, лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения контроля безопасности пищевой продукции и продовольственного сырья.

3. Инструкция разработана с целью обеспечения единого методического подхода для контроля ГМО в пищевых продуктах и продовольственном сырье.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4. Инструкция содержит скрининговые методы, направленные на идентификацию и количественное определение рекомбинантной ДНК: промотора 35S из вируса мозаики цветной капусты, терминатора NOS из *Agrobacterium tumefaciens* и маркерных генов, позволяющих проводить предварительную проверку продовольственного сырья и пищевой продукции на наличие ГМО.

5. Инструкция представляет методы, направленные на идентификацию и количественное определение видоспецифичной рекомбинантной ДНК, характерной для генетических конструкций и уникальных трансформационных событий для осуществления окончательной идентификации линии ГМО растительного происхождения.

6. Анализ пищевых продуктов и продовольственного сырья на наличие ГМО включает на первом этапе качественное определение (идентификация рекомбинантной ДНК). При получении положительного результата проводят определение количественного содержания генно-модифицированного компонента (далее – ГМ) в образце (%).

ГЛАВА 3 АППАРАТУРА, ИНСТРУМЕНТЫ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

7. Для проведения идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения используется следующая аппаратура и инструменты:

амплификаторы типа ABI Prism 7000, iCycler iQ, Rotor Gene -3000 (6000), АНК -32, «Терцик МС-2» и другие;

ПЦР боксы с бактерицидной лампой или стерильные ламинарные шкафы (по одному для зоны 1 (этап выделения ДНК) и зоны 2 (этап амплификации));

прибор для горизонтального электрофореза типа «Mini- Sub Cell GT System» с комплектом кювет и гребенок;

источник напряжения типа «Power Pac 300» с диапазоном регулируемого напряжения 50 - 300 В;

трансиллюминатор типа T12 с защитным экраном, диапазон излучения 300-400 нм;

видеосистема типа «Gel Doc 2000™», предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминисцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием, чувствительность – не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию);

холодильник бытовой электрический с температурой морозильной камеры минус 20°С;

микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 13000 мин⁻¹);

термостат типа «ТЕРМО 24-15» под пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, диапазон температур от 15°С до 120°С, количество гнезд – не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры – 0,2 °С, разность температур между соседними ячейками – не более 0,5 °С;

термостат суховоздушный типа ТВЗ-25 с рабочей температурой 42°С, рабочий диапазон от 20°С до 60°С, точность поддержания температуры ± 1°С;

аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения 250 - 3000 мин⁻¹;

печь микроволновая (мощностью не менее 400 W);

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

анализатор потенциометрический типа МР 220, погрешность измерений pH $\pm 0,01$;

гомогенизатор перистальтического типа «Стомайкер» или других моделей;

облучатель бактерицидный настенный типа ОБН-150;

дозаторы с переменным объёмом дозирования: 0,2 – 2,0 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью $\pm 1,2\%$; 0,5 – 10,0 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью $\pm 0,8\%$; 2- 20 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью $\pm 0,8\%$; 20– 200 мкл с шагом 0,1 мкл, с точностью $\pm 0,6\%$; 00 – 1000 мкл с шагом 1 мкл, с точностью $\pm 3\%$; 2 – 10 мл с шагом 0,1 мл, с точностью $\pm 0,5\%$.

8. Для проведения идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения используется следующая лабораторная посуда:

цилиндры мерные лабораторные вместимостью 10, 25, 100, 1000 мл;

колбы мерные лабораторные вместимостью 25, 50, 100, 250, 1000 мл;

пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2, 0,5, 1,5 мл;

наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объёмом дозирования до: 10; 20; 200; 1000 мкл; 10 мл.

9. Для проведения идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения используются следующие реактивы:

кислота соляная;

кислота борная;

натрий едкий;

натрий хлористый;

этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА);

гексадецилтриметиламмоний бромид (СТАВ);

трис (оксиметил) аминометан;

альбумин бычий сывороточный сухой (БСА);

этидий бромистый;

спирт этиловый;

спирт изопропиловый;

хлороформ;

вода деионизированная;

вода дистиллированная;

2-меркаптоэтанол;

термостабильный фермент Таq-полимераза, оптимум работы в области 70°C - 72°C;

буфер для ПЦР с $MgCl_2$;

- агароза для электрофореза (тип II);
 - стандартный образец состава генетически немодифицированного организма растительного происхождения;
 - стандартный образец состава ГМО растительного происхождения;
 - 2'- дезоксиаденозин-5'трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (АТФ);
 - 2'- дезоксицитидин-5' трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ);
 - 2'-дезоксигуанозин-5'трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ГТФ);
 - 2'- дезокситимидин - 5' трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ТТФ);
 - праймеры;
 - 3% -ный раствор перекиси водорода;
10. Допускается использование другой аппаратуры, инструментов и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных выше отечественного и зарубежного производства, разрешенные для применения в установленном порядке.

ГЛАВА 4

ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

11. От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:

от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5-10 г) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20 x 30 см с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50-100 г);

из общей пробы отбирают среднюю пробу в 10-20 г, помещают в полиэтиленовый пакет с застежкой-молнией размером не более 10x15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20 x 30 см, опечатывают и отправляют на анализ.

12. От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу весом 10-50 г в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с застежкой-молнией размером не более 10x15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96%-ном этаноле и

обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, печатаывают и отправляют на анализ.

13. Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 см³, печатаывают и отправляют на анализ.

14. При отборе проб составляют акт отбора проб, который вместе с отобранной пробой отправляют в лабораторию.

15. Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и пестики, предварительно обработанные хромовой смесью и фламбированные инструменты - пинцеты, скальпели, ножницы.

16. Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 3-5 г и растирают пестиком до гомогенного состояния.

17. Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 3-5 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до гомогенного состояния.

18. Пробы продуктов консистенции крахмала весом 100-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 см³ физиологического раствора. Для анализа необходимо 50-150 мм³ образца.

19. Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими микродозаторами с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50-150 мкл образца.

20. Из полученных гомогенатов и суспензий проводят выделение ДНК.

21. Образцы сырья и продуктов хранят в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания. Образцы скоропортящихся продуктов хранят в замороженном состоянии (при температуре минус 20°C) в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа).

22. Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

ГЛАВА 5 ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

23. Приготовление растворов

23.1. Приготовление 1М ТРИС – HCl (pH 7,5):

в мерной колбе на 100 мл растворить 12,11 г Трис (оксиметил) аминметана в 80 мл дистиллированной воды, довести pH

концентрированной соляной кислотой до 7,5, довести объем раствора до метки деионизированной водой, перемешать, хранить при температуре – 20С° в течение не более года.

23.2. Приготовление 5М NaCl:

в 100 мл дистиллированной воды растворить 29,22 г натрия хлористого, перемешать; хранить в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года;

23.3. Приготовление 30% NaOH:

в 7 мл дистиллированной воды растворить 3,0 г натрия гидроокиси.

23.4. Приготовление 0,5 М ЭДТА (рН 8,0):

в мерной колбе на 100 мл растворить 18,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты в 80 мл дистиллированной воды, раствором 30%-ной натрия гидроокиси довести рН раствора до 8,0, дистиллированной водой объем раствора довести до метки, перемешать; хранить в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года.

23.5. Приготовление хлороформа, насыщенного водой:

смешать 100 мл хлороформа с 20 мл деионизированной воды и оставить на 24 ч для насыщения; хранить при температуре от 4°С до 5°С не более 6 мес.

23.6. Приготовление 70%-ного раствора этилового спирта:

смешать 70 мл 96%-ного этилового спирта с 26 мл деионизированной воды; хранить при температуре от 4°С до 5°С не более 2 мес.

23.7. Приготовление раствора БСА (20мкг/ мл):

растворить 0,002 г сухого альбумина бычьего сывороточного в 1 мл деионизированной воды, 10 мкл полученного раствора смешать с 990 мкл деионизированной воды; хранить в морозильной камере при температуре минус 20°С не более 6 мес.

23.8. Приготовление лизирующего буфера (2%-ного «СТАВ»):

растворить 0,5 г гексадецилтриметиламмония бромида в 10 мл деионизированной воды, добавить 2,5 мл 1М Трис – HCl, 7 мл 5М NaCl, 1мл 0,5 М ЭДТА, довести объем раствора деионизированной водой до 25 мл, перемешать; хранить при температуре от 4°С до 5°С не более 6 мес.

23.9. Приготовление 1 х ТВЕ буфера для электрофореза:

в мерной колбе на 1000 мл растворить 10,8 г Трис (оксиметил) аминометана, 5,5г борной кислоты и 0,92г этилендиаминтетрауксусной кислоты, довести дистиллированной водой до метки, перемешать до полного растворения; хранить раствор 10 дней.

23.10. Приготовление раствора бромистого этидия (10 мг/мл):

растворить 1,0 г бромистого этидия в 100 мл дистиллированной воды; хранить в посуде из темного стекла при температуре от 4°C до 5°C 12 мес.

23.11. Приготовление осаждающего буфера СТАВ:

в мерную колбу внести 1,0 г СТАВ, 0,5 г NaCl, добавить 100 мл деионизированной воды, довести раствором 30%-ной натрия гидроокиси рН раствора до 8,0, довести объем деионизированной водой до 200 мл; хранить при 4 °С не более 6 месяцев.

23.12. Приготовление 1,2 М NaCl:

растворить 7,0 г NaCl в 100 мл деионизированной воды, перемешать; хранить в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года.

23.13. Приготовление 2 % агарозного геля:

добавить 1 г агарозы в 50 мл 1х буфера TBE, тщательно перемешать; полученный раствор поместить в микроволновую печь на 2-5 мин или прокипятить на водяной бане 15 мин до полного расплавления агарозы; расплавленную агарозу охладить до 56° С, добавить 5 мкл бромистого этидия, тщательно перемешать; разлить в подготовленную форму, толщина геля 0,5-0,7 см; через 30-40 минут удалить гребенку; готовый гель использовать сразу или хранить в 1х TBE буфере в холодильнике при +4°C.

ГЛАВА 6 ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

24. Метод выделения ДНК с помощью СТАВ:

навеску исследуемого гомогенизированного продукта массой 100 мг поместить в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл; добавить 300 мкл деионизированной воды, перемешать шпателем; добавить 500 мкл лизирующего СТАВ-буфера с меркаптоэтанолом, тщательно перемешать шпателем; инкубировать при 65°C 90 минут; центрифугировать 10 минут при 13000 об/мин; перенести 500 мкл супернатанта в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл; добавить 500 мкл хлороформа, перемешать на вортекс 30 секунд; центрифугировать 10 минут при 13000 об/мин; перенести 500 мкл верхней фракции в чистую пробирку, добавить 500 мкл хлороформа, перемешать; центрифугировать 5 минут при 13000 об/мин;

перенести верхнюю фракцию в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл, не захватывая слой хлороформа;

добавить 2 объема СТАВ-осаждающего буфера, перемешать пипетированием;

инкубировать 60 минут при комнатной температуре;

центрифугировать 5 минут при 13000 об/мин, удалить супернатант;

растворить осадок в 350 мкл NaCl (1,2 М);

добавить 350 мкл хлороформа, перемешать на вортекс 30 секунд;

центрифугировать 10 минут при 13000 об/мин;

перенести верхнюю фракцию в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл;

добавить 0,6 объема изопропилового спирта, перемешать;

центрифугировать 10 минут при 13000 об/мин, удалить супернатант;

добавить 500 мкл 70%-ного раствора этилового спирта и перемешать на вортекс;

центрифугировать 10 минут при 13000 об/мин, удалить супернатант;

подсушить осадок не более 5 минут при 65 °С для удаления капель спирта;

растворить осадок в 100 мкл деионизированной воды, осторожно встряхивая, полученный раствор ДНК готов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР);

хранить при температуре минус 20 °С.

25. Сорбционный метод выделения ДНК:

в центрифужные пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл внести 300 мг бисера и 70-80 мг анализируемого материала, добавить 0,5 мл 5 мМ Na₂-соль ЭДТА и термостатировать 30-60 минут при 65 °С;

к содержимому пробирки добавить 400 мкл лизирующего реагент, перемешать на вортекс до максимально однородного состояния, термостатировать при 65 °С 60-120 минут;

перемешать на вортекс, добавить 500 мкл бидистиллированной воды, перемешать на вортекс;

центрифугировать 1 минуту при 12 000 об/мин, прозрачный супернатант перенести в чистую пробирку;

добавить 20 мкл сорбента, пробирку поместить на ротатор или перемешивать на вортекс 10 минут при 10-20 об/мин;

центрифугировать 10 секунд при 12 000 об/мин.;

удалить супернатант, к осадку добавить 200 мкл лизирующего реагента, перемешать на вортекс до однородного состояния, центрифугировать 10 секунд при 12 000 об/мин;

удалить супернатант, к осадку добавить 1 мл рабочего раствора солевого буфера, перемешать содержимое пробирки переворачиванием 5-10 раз, центрифугировать 10 секунд при 12 000 об/мин;

удалить супернатант, не задевая, осадка;

к осадку добавить 1 мл рабочего раствора солевого буфера, перемешать на вортекс, центрифугировать 10 секунд при 12 000 об/мин, удалить супернатант;

к осадку еще раз добавить 1 мл рабочего раствора солевого буфера, перемешать на вортекс, центрифугировать 10 секунд при 12 000 об/мин, удалить супернатант;

подсушить осадок при 65°C в течение 4-5 минут;

к осадку добавить 50 мкл экстракционного раствора, отбор раствора из исходного флакона проводить при постоянном помешивании, не допуская выпадения в осадок гранул ионообменной смолы;

суспендировать содержимое пробирки на вортекс 5-10 секунд до гомогенного состояния, затем термостатировать 10 минут при 65°C;

повторно суспендировать пробу на вортекс, центрифугировать 1 минуту при 12 000 об/мин;

раствор ДНК перенести в чистую пробирку; хранить при температуре минус 20°C.

26. Допускается использование коммерческих тест-систем для выделения ДНК отечественного и зарубежного производства, разрешенных для применения в установленном порядке, в соответствии с инструкцией изготовителя.

ГЛАВА 7

МЕТОД ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

27. Идентификация видоспецифичной растительной ДНК

27.1. Идентификация ДНК сои, ген лектина

27.1.1. Праймеры:

5' GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C 3' (праймер 1);

5' GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG 3' (праймер 2).

27.1.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	193,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	12,50
Праймер 1 (20 мкМ)	6,25
Праймер 2 (20 мкМ)	6,25

Тақ-полимераза (5 единиц/мкл) 1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

27.1.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C,
Амплификация	30 сек/95°C, 30 сек/60°C, 40 сек/72°C,
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 118 пар нуклеотидов, приложение 1.

27.2. Идентификация ДНК кукурузы, ген зеина

27.2.1. Праймеры:

5' TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG 3' (праймер 1),

5' GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT 3' (праймер 2).

27.2.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	193,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 мМ)	12,50
Праймер 1 (20 мкМ)	6,25
Праймер 2 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла;

27.2.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/95°C
Амплификация	1 мин/94°C, 1 мин/60°C, 1 мин/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	7 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 329 пар нуклеотидов, приложение .2.

27.3. Идентификация ДНК картофеля, ген фосфоенолпируват карбоксилазы

27.3.1. Праймеры:

5' GTC TCC TTG GCT TGT CAT TTT ATG C 3' (праймер 1),

5' САА GTT AGC TGC CAT CAT TCT GGC C 3' (праймер 2).

27.3.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	188,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	12,50
Праймер 1 (20 мкМ)	6,25
Праймер 2 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс и центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

27.3.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C
Амплификация	1 мин/94°C, 1 мин/60°C, 1 мин/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	7 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 1149 пар нуклеотидов.

28. Скрининговый анализ

28.1. Метод идентификации промотора 35 S

28.1.1. Праймеры:

5' GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3' (праймер 1),

5' GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3' (праймер 2)

28.1.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

28.1.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин/4°C
Скорость нагрева	0,77°C/сек
Скорость остывания	3,15°C/сек

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 195 пар нуклеотидов, приложение 3.

28.2 Метод идентификации терминатора NOS

28.2.1. Праймеры:

5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3' (праймер 1),

5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3' (праймер 2).

28.2.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 мМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла;

28.2.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин/4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 180 пар нуклеотидов, приложение 4.

28.3. Метод идентификации маркерного гена *npt II* :

28.3.1. Праймеры:

5' GGA TCT CCT GCT ATC T 3' (праймер 1),

5' GAT CAT CCT GAT CGA C 3' (праймер 2).

28.3.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	16,53
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	3,30
Раствор БСА (20 мкг/мл)	3,30

Смесь нуклеотидов (4 млМ)	0,62
Праймер 1 (32 пикомоль/мкл)	0,40
Праймер 2 (59 пикомоль/мкл)	0,20
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,15

Реакционную смесь перемешать на вортекс и центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

28.3.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	30 сек/95°C, 50 сек/50°C, 40 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 173 пары нуклеотидов.

29. Идентификация линий ГМИ

29.1. Метод идентификации сои линии 40-3-2

29.1.1. Внешние праймеры (первый раунд):

5'ССА СТГ АСГ ТАА GGG АТГ АСГ 3' (праймер 1),

5'САТ GAA GGA ССГ GTG GGA GАТ 3' (праймер 2).

29.1.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	188,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	12,50
Праймер 1 (20 мкМ)	6,25
Праймер 2 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при

использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.1.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C
Амплификация	30 сек/95°C, 30 сек/60°C, 40 сек/72°C
Количество циклов амплификации	25
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы поместить на холод, хранение не более одного часа в холодильнике до проведения 2 –го раунда;

29.1.4. Внутренние праймеры (второй раунд):

5' ATC CCA CTA TCC TTC GCA AGA 3' (праймер 3),

5' TGG GGT TTA TGG AAA TTG GAA 3' (праймер 4).

29.1.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	193,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 мМ)	12,50
Праймер 3 (20 мкМ)	6,25
Праймер 4 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,5 мкл в каждую, добавить 0,5 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла;

29.1.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C
Амплификация	30 сек/95°C, 30 сек/60°C, 40 сек/72°C
Количество циклов амплификации	35

Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза, продукт амплификации 169 пар нуклеотидов, приложение 5.

29.2. Метод идентификации сои линии A2704-12

29.2.1. Праймеры:

5' GGC GTT CGT AGT GAC TGA GG 3' (праймер 1),

5' GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG 3' (праймер 2).

29.2.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 мМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.2.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 185 пар нуклеотидов.

29.3. Метод идентификации сои линии A5547-127

29.3.1. Праймеры:

5' TGT GGT TAT GGC GGT GCC ATC 3' (праймер 1),

5' TGC TAC AGG CAT CGT GGT GTC 3' (праймер 2).

29.3.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла;

29.3.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 150 пар нуклеотидов.

29.4. Метод идентификации кукурузы линии Vt 176

29.4.1. Внешние праймеры (первый раунд):

5' CGG CCC CGA GTT CAC CTT 3' (праймер 1),

5' CTG CTG GGG ATG ATG TTG TTG 3' (праймер 2).

29.4.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	188,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	12,50
Праймер 1 (20 мкМ)	6,25

Праймер 2 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс и центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.4.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C
Амплификация	40 сек/95°C, 40 сек/60°C, 40 сек/72°C
Количество циклов амплификации	25
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы поместить на холод, хранение не более одного часа в холодильнике до проведения 2 –го раунда.

29.4.4. Внутренние праймеры (второй раунд):

5' CCG CAC CCT GAG CAG CAC 3' (праймер 3),

5' GGT GGC ACG TTG TTG TTC TGA 3' (праймер 4).

29.4.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	193,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	12,50
Праймер 3 (20 мкМ)	6,25
Праймер 4 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,5 мкл в каждую, добавить 0,5 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.4.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
--------	------------------------

Денатурация	3 мин/ 95°C
Аmplификация	40 сек/95°C, 40 сек/60°C, 40 сек/72°C
Количество циклов амплификации	35
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 189 пар нуклеотидов.

29.5. Метод идентификации кукурузы линии MON 810

29.5.1. Внешние праймеры (первый раунд):

5' TAT CTC CAC TGA CGT AAG GGA TGA C 3' (праймер 1),

5' TGC CCT ATA ACA CCA ACA TGT GCT T 3' (праймер 2);

29.5.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	188,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 мМ)	12,50
Праймер 1 (20 мкМ)	6,25
Праймер 2 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.5.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C
Аmplификация	45 сек/95°C, 50 сек/60°C, 50 сек/72°C

Количество циклов амплификации	35
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

29.5.4. Внутренние праймеры (второй раунд):

5' ACT ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCTC 3' (праймер 3),
 5' GCA TTC AGA GAA ACG TGG CAG TAA C 3' (праймер 4).

29.5.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10

проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	193,70
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	25,00
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	12,50
Праймер 3 (20 мкМ)	6,25
Праймер 4 (20 мкМ)	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

Реакционную смесь перемешать на вортекс и центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,5 мкл в каждую, добавить 0,5 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать (30 секунд при 3000 об/мин), при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.5.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 95°C
Амплификация	45 сек/95°C, 50 сек/60°C, 50 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 149 пар нуклеотидов, приложение 6.

29.6. Метод идентификации кукурузы линии MON 863:

29.6.1. Праймеры:

5' GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C 3' (праймер 1),
 5' TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT 3' (праймер 2).

29.6.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10

проб

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0

Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс и центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.6.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. / 4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации 84 пары нуклеотидов.

27.7 Метод идентификации кукурузы линии НК 603

29.7.1. Праймеры:

5' AGT AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA 3' (праймер 1),

5' AAG AGA TAA CGA GAT CCA CTC AAA CAC T 3' (праймер 2).

29.7.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при

использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.7.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. - 4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 108 пар нуклеотидов.

29.8. Метод идентификации кукурузы линии Vt 11

29.8.1. Праймеры:

5' CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C 3' (праймер 1),

5' TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC 3' (праймер 2).

29.8.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем , мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.8.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	10 мин/ 95°C
Амплификация	30 сек/95°C, 60 сек/63°C, 60 сек/72°C

Количество циклов	
амплификации	10
Амплификация	30 сек/95°C, 30 сек/60°C, 30 сек/95°C

Количество циклов	
амплификации	30
Конечное удлинение	7 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. / 4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 110 пар нуклеотидов.

29.9. Метод идентификации кукурузы линии Т 25

29.9.1. Праймеры:

5' GCC AGT TAG GCC AGT TAC CCA 3' (праймер 1),

5' TGA GCG AAA CCC TAT AAG AAC CCT 3' (праймер 2).

29.9.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.9.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	10 мин/ 95°C
Амплификация	30 сек/95°C, 60 сек/63°C, 60 сек/72°C

Количество циклов	
амплификации	10
Амплификация	30 сек/95°C,

	30 сек/60°C, 30 сек/95°C
Количество циклов амплификации	30
Конечное удлинение	7 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. - 4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 149 пар нуклеотидов.

29.10. Метод идентификации кукурузы линии GA 21

29.10.1. Праймеры:

5' ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG 3' (праймер 1),

5' TCT CCT TGA TGG GCT GCA 3' (праймер 2).

29.10.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс и центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.10.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. - 4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 270 пар нуклеотидов.

29.11. Метод идентификации кукурузы линии MIR 604

29.11.1. Праймеры:

5' GGT ACC CAT TTG GCG CCG AT 3' (праймер 1),

5' CAG CGT TGC GGT TCT GTC AG 3' (праймер 2).

29.11.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор ДНК	0,5
Праймер 1 (20 мкМ)	1,0
Праймер 2 (20 мкМ)	1,0
Буферная смесь	2,5
Тақ-полимераза	0,2
Деионизированная вода	19,8

29.11.3. Состав буферной смеси:

Реактивы	Объем, мкл
1 М KCL	500
100 мМ dATP	20
100 мМ dCTP	20
100 мМ dTTP	20
100 мМ dGTP	20
100 мМ MgC ₂	150
Деионизированная вода	170
1 М Tris-HCl-pH 8,3	100

29.11.4. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	4 мин /94°C
Амплификация	30 сек/95 °С, 30 сек/55 °С, 2 мин/72 °С
Количество циклов амплификации	34
Конечное удлинение	5 мин/72°C
Фаза остывания	до конца/ 4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 895 пар нуклеотидов.

29.12. Метод идентификации кукурузы линии MON 88017

29.12.1. Праймеры:

5' GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT 3' (праймер 1),

5' TCC GGA GTT GAC CAT CCA 3' (праймер 2).

29.12.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор ДНК	0,5
Праймер 1 (20 мкМ)	1,0
Праймер 2 (20 мкМ)	1,0
Буферная смесь	2,5
Тaq-полимераза	0,2
Деионизированная вода	19,8

29.12.3. Состав буферной смеси:

Реактивы	Объем, мкл
1 М KCL	500
100 мМ dATP	20
100 мМ dCTP	20
100 мМ dTTP	20
100 мМ dGTP	20
100 мМ MgC ₂	150
Деионизированная вода	170
1 М Tris-HCl-pH 8,3	100

29.12.4. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	4 мин/94°C
Амплификация	30 сек/95 °C, 30 сек/55 °C, 2 мин/72 °C
Количество циклов амплификации	34
Конечное удлинение	5 мин/72°C
Фаза остывания	до конца/4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации – 94 пары нуклеотидов.

29.13. Метод идентификации сахарной свеклы линии Н7-1

29.13.1. Праймеры:

5' TGG GAT CTG GGT GGC TCT AAC T 3' (праймер 1),

5' AAT GCT GCT AAA TCC TGA G 3' (праймер 2).

29.13.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0

Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.13.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. /4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации 110 пар нуклеотидов, приложение 7.

29.14. Метод идентификации риса линии LL 62

29.14.1. Праймеры:

5'AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG G3' (праймер 1),

5' TGC TAA CGG GTG CAT CGT CTA 3' (праймер 2).

29.14.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	169,0
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	29,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	29,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	14,0
Праймер 1 (20 мкМ)	7,0
Праймер 2 (20 мкМ)	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку,

перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.14.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/ 94°C
Амплификация	20 сек/94°C, 40 сек/54°C, 60 сек/72°C
Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	1 мин. /4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле, продукт амплификации 88 пар нуклеотидов, приложение 8.

29.15. Метод идентификации картофеля, устойчивого к колорадскому жуку сортов Рассет Бурбанк Ньюлив, Супериор Ньюлив, Елизавета 2904/1 kgs, Луговской 1210 amk

29.15.1. Внешние праймеры (первый раунд):

5' СТА ССА СТА AGG ATG ТТА ТСС 3' (праймер 1),
5' ATG САС ТСА CGT AGT ССТ СС 3' (праймер 2).

29.15.2. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем , мкл
Деионизированная вода	161,3
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	33,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	33,0
Смесь нуклеотидов (10 млМ)	6,2
Праймер 1 (20 мкМ)	2,5
Праймер 2 (20 мкМ)	2,5
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,0 мкл в каждую, добавить 1,0 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.15.3. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	2 мин/ 98°C

Амплификация	30 сек/95°C, 30 сек/60°C 40 сек/72°C
--------------	--

Количество циклов амплификации	20
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

Хранить не более одного часа в холодильнике до проведения второго раунда.

29.15.4. Внутренние праймеры (второй раунд):

5' СТА ССА СТА AGG ATG ТТА ТСС 3' (праймер 3),

5' TTG ТАТ АГА АГС ТСА СГА GG 3' (праймер 4).

29.15.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, рассчитанная на 10 проб:

Реактивы	Объем, мкл
Деионизированная вода	164,8
Буфер для ПЦР с MgCl ₂ (10x)	33,0
Раствор БСА (20 мкг/мл)	33,0
Смесь нуклеотидов (10 млМ)	6,2
Праймер 3 (20 мкМ)	2,5
Праймер 4 (20 мкМ)	2,5
Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

Реакционную смесь перемешать на вортекс, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, разлить в пробирки для проведения ПЦР по 24,5 мкл в каждую, добавить 0,5 мкл раствора ДНК в каждую пробирку, перемешать, центрифугировать 30 секунд при 3000 об/мин, при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавить каплю минерального масла.

29.15.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	2 мин/ 98°C
Амплификация	30 сек/95°C, 30 сек/60°C, 40 сек/72°C

Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	3 мин/72°C
Фаза остывания	4°C

После проведения амплификации пробы готовы для проведения электрофореза, продукт амплификации – 102 пары нуклеотидов, приложение 9.

30. Проведение электрофореза в агарозном геле:

- 10 мкл реакционной смеси после амплификации внести в лунку геля, в одну из лунок внести маркер молекулярной массы;
- поместить заполненный гель в камеру для электрофореза с буфером 1x ТБЕ, толщина слоя буфера над поверхностью геля ~ 2-3 мм.;
- провести электрофорез в режиме постоянного напряжения 100V 70 - 90 минут;
- гель (без формы) поместить на экран трансиллюминатора;
- документировать результат электрофореза при помощи геле-документирующей системы, фотокопию геля приложить к отчету по идентификации.

ГЛАВА 8 МЕТОД ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

31. Идентификация видоспецифичной ДНК. Скрининговый анализ

31.1.Метод количественного определения генетически модифицированной сои

31.1.1. Метод позволяет количественно определить рекомбинантную ДНК, характерную для генетически модифицированных линий сои в пищевых продуктах методом ПЦР в реальном времени;

анализ проводится по гену лектина, который присутствует в геноме всех линий сои, и универсальной последовательности 35 S промотора вируса мозаики цветной капусты, который присутствует в геноме всех генетически модифицированных линий сои.

31.1.2. Праймеры на ген лектина:

5' TCC ACC CCC ATC CAC ATT T 3' (праймер 1),

5' GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA 3' (праймер 2),

5'- FAM- AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG- TAMRA- 3' (праймер 3);

длина ампликона 81 пара нуклеотидов.

31.1.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' GCC TCT GCC GAC AGT GGT 3' (праймер 4),

5' AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C 3' (праймер 5),

5' -FAM –CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA -3' (праймер 6);

длина ампликона 82 пары нуклеотидов.

31.1.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК сои:

Реактивы

Объем, мкл

Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ (25 ммоль/л)	5 ммоль/л
Праймеры 1,2	900 нмоль/л каждого
dUTP	400 ммоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (2,5 ммоль/л каждого)	200 ммоль/л каждого
Праймер 3	100 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 50,00 мкл

31.1.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ (25 ммоль/л)	5 ммоль/л
Праймеры 4,5	900 нмоль/л каждого
dUTP	400 ммоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (2,5 ммоль/л каждого)	200 ммоль/л каждого
Праймер 6	100 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 50,00 мкл

При проведении исследования используют стандартные образцы состава генетически модифицированной сои.

31.1.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2мин/50°C
Денатурация	10 мин/ 95°C
Амплификация	15 сек/95°C, 60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

Анализ результатов исследования представлен в приложении 10.

31.2. Метод количественного определения генетически модифицированной кукурузы

31.2.1. Метод позволяет количественно определить рекомбинантную ДНК, характерную для генетически модифицированных линий кукурузы, в пищевых продуктах методом ПЦР в реальном времени;

анализ проводится по гену инвертазы кукурузы, который присутствует в геноме всех линий кукурузы, и универсальной последовательности 35 S промотора вируса мозаики цветной капусты, который присутствует в геноме всех генетически модифицированных линий за исключением GA 21.

31.2.2. Праймеры на ген инвертазы кукурузы:

5' CAC TCC ATC GTG GAG AGC TT 3' (праймер 1),

5' GGC GTT GTT GAA GAG GAA GA 3' (праймер 2),

5'-FAM-TAC CCC ACA CGA GCC ATC TAC GAC T - TAMRA -3' (праймер 3);

длина ампликона 111 пар нуклеотидов.

31.2.3. Праймеры, на целевую последовательность ГМИ:

5' CGT CTT CAA AGC AAG TGG ATT G 3' (праймер 4),

5' TCT TGC GAA GGA TAG TGG GAT T 3' (праймер 5),

5' -FAM –TCT CCA CTG ACG TAA GGG ATG ACG CA -TAMRA - 3' (праймер 6);

длина ампликона 79 пар нуклеотидов.

31.2.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ (25 ммоль/л)	5 ммоль/л
Праймеры 1,2	900 нмоль/л каждого
dUTP	400 ммоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (2,5 ммоль/л каждого)	200 ммоль/л каждого
Праймер 3	100 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 50,00 мкл

31.2.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00

Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ (25 ммоль/л)	5 ммоль/л
Праймеры 4,5	900 нмоль/л каждого
dUTP	400 ммоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (2,5 ммоль/л каждого)	200 ммоль/л каждого
Праймер 6	100 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 50,00 мкл

При проведении исследования используют стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы.

31.2.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация	10 мин/ 95°C
Амплификация	15 сек/95°C, 30 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	50

Анализ результатов исследований представлен в приложение 11.

31.3. Метрологические характеристики метода:

границы интервала, в котором погрешность определения находится с доверительной вероятностью $P=0,95$, составляют от 0,1 до 5%, нижнюю и верхнюю границы погрешности определяют с использованием сертифицированных стандартных образцов состава и свойств, стандартные отклонения повторяемости результатов (δ) составляет от 0,067 (для стандарта 0,1%) до 0,540 (для стандарта 5%), что соответствует погрешности сертифицированных стандартных образцов состава ГМО растительного происхождения;

результаты анализа образцов принимают, если коэффициент корреляции калибровочной прямой, построенной по сертифицированным стандартным образцам состава ГМО растительного происхождения, по методу наименьших квадратов (R^2) $>0,97$.

32. Идентификация линий ГМО

32.1. Метод количественного определения сои линии 40-3-2

32.1.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена лектина и генетической конструкции, характерной для сои линии 40-3-2; используются зонды, специфичные к трансгену и гену лектина, меченые красителями FAM и VIC соответственно; для построения

калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной сои:- 5,0 %, 2,0 %, 1,0 %, 0,5 % и 0,00 %.

32.1.2. Праймеры на ген лектина сои:

5' TCC ACC CCC ATC CAC ATT TЗ' (праймер 1),

5' GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA 3' (праймер 2),

5'-VIC-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG- TAMRA -3' (праймер 3).

32.1.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT 3' (праймер 4),

5' GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C 3' (праймер 5),

5' -FAM –CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG- TAMRA-3' (праймер 6).

32.1.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 50- 200 нг)	5,00
Деионизированная вода	18,30
Праймеры 1,2 (20 мкМ)	0,10 каждого
Праймеры 4,5 (20 мкМ)	0,25 каждого
Праймеры 3,6 (10 мкМ)	0,50 каждого
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,00
Буфер для ПЦР 10 X	10,60
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,40
Итого:	50,00

32.1.5. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.2. Метод количественного определения сои линии А2704-12

32.2.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени, с определением гена лектина и области ДНК, специфичной трансформационному событию А2704-12;используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной сои А2704-12: 0,1, 0,4, 0,9, 2,0 3,3%.

32.2.2. Праймеры на ген лектина сои:

5' CAC CTT TCT CGC ACC AAT TGA CA3' (праймер 1),
 5' TCA AAC TCA ACA GCG ACG AC 3' (праймер 2),
 5' FAM-CCA CAA ACA CAT GCA GGT TAT CTT GG - TAMRA -
 3'(праймер 3);

длина ампликона 105 пар нуклеотидов.

32.2.3. Праймеры на целевую последовательность ГМО:

5' GCA AAA AAG CGG TTA GCT CCT3' (праймер 4),

5' ATT CAG GCT GCG CAA CTG TT 3' (праймер 5),

5' -FAM –CGG TCC TCC GAT CGC CCT TCC -TAMRA-3' (праймер

6);

длина ампликона 64 пары нуклеотидов.

32.2.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК сои:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 50- 200 нг)	5,0
Деионизированная вода	18,0
Праймеры 1,2 (20 мкМ)	0,5 каждого
Праймер 3 (10 мкМ)	1,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,0
Буфер для ПЦР 10 X	10,6
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,4
Итого:	50,0

32.2.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 50- 200 нг)	5,0
Деионизированная вода	17,0
Праймеры 4,5 (20 мкМ)	1,0 каждого
Праймер 6 (10 мкМ)	1,0
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,0
Буфер для ПЦР 10 X	10,6
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,4
Итого:	50,0

32.2.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C

Амплификация

Денатурация	15 сек/95°C,
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.3. Метод количественного определения кукурузы линии MON 810

32.3.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез группы белков, присущих для всех линий кукурузы (*hmg*) и области ДНК, специфичной трансформационному событию MON 810, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции промотора 35 S из вируса мозаики цветной капусты; используются зонды, меченные красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы- < 0,02, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 %;

32.3.2. Праймеры на ген *hmg*:

5' TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCC CA 3' (праймер 1),

5' GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T 3' (праймер 2),

5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA - TAMRA -3' (праймер 3);

длина ампликона 79 пар нуклеотидов.

32.3.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT 3' (праймер 4),

5' GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT 3' (праймер 5),

5' -FAM -AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC -TAMRA-3' (праймер 6);

длина ампликона 92 пары нуклеотидов.

32.3.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 50- 200 нг)	5,0
Деионизированная вода	19,3
Праймеры 1,2 (20 мкМ)	0,1 каждого
Праймер 3 (10 мкМ)	0,5
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,0
Буфер для ПЦР 10 X	10,6
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,0
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,4
Итого:	50,0

32.3.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
----------	------------

Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 50- 200 нг)	5,0
Деионизированная вода	19,0
Праймеры 4,5 (20 мкМ)	0,25 каждого
Праймер 6 (10 мкМ)	0,5
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,0
Буфер для ПЦР 10 X	10,6
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,0
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,4
Итого:	50,0

32.3.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C,
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.4. Метод количественного определения кукурузы линии MON 863

32.4.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1 (*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы и области ДНК, специфичной трансформационному событию MON 863, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы: 0,01, 1,0, 5,0, 10,0 %.

32.4.2. Праймеры на ген *adh1 1*:

5' CCA GCC TCA TGG CCA AAG 3' (праймер 1),

5' CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG 3' (праймер 2),

5'-FAM-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT -3' (праймер 3);

длина ампликона 84 пары нуклеотидов.

32.4.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C 3' (праймер 4),

5' TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT 3' (праймер 5),

5' -FAM -TGA ACA CCC ATC CGA ACA AGT AGG GTC A - TAMRA-3' (праймер 6);

длина ампликона 70 пар нуклеотидов.

32.4.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	4,00
Деионизированная вода	19,00
Праймеры 1,2 (10 мкМ)	0,75 каждого
Праймер 3 (5 мкМ)	0,50
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,00
Буфер для ПЦР 10 X	10,60
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,00
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,40
Итого:	50,00

32.4.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	4,00
Деионизированная вода	19,00
Праймеры 4,5 (10 мкМ)	0,75 каждого
Праймер 6 (5 мкМ)	0,50
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,00
Буфер для ПЦР 10 X	10,60
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,00
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,40
Итого:	50,00

32.4.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

35.5. Метод количественного определения кукурузы линии НК 603

32.5.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1 (*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы и области ДНК, специфичной трансформационному событию НК 603, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются

стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы 0,1, 0,49, 0,98, 1,96, 4,91%;

32.5.2. Праймеры на ген *adh1 1*:

5' CCA GCC TCA TGG CCA AAG 3' (праймер 1),

5' CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG 3' (праймер 2),

5'-FAM-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT -3' (праймер 3);

длина ампликона 70 пар нуклеотидов.

32.5.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA 3' (праймер 4),

5' AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T 3' (праймер 5),

5' -FAM -TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC -TAMRA-3' (праймер 6);

длина ампликона 108 пар нуклеотидов.

32.5.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	4,00
Деионизированная вода	19,00
Праймеры 1,2 (10 мкМ)	0,75 каждого
Праймер 3 (5 мкМ)	0,50
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,00
Буфер для ПЦР 10 X	10,60
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,40
Итого:	50,00

32.5.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР (количественное определение рекомбинантной ДНК):

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	4,00
Деионизированная вода	19,00
Праймеры 4,5 (10 мкМ)	0,75 каждого
Праймер 6 (5 мкМ)	0,50
Смесь нуклеотидов (4 млМ)	10,00
Буфер для ПЦР 10 X	10,60
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,40
Итого:	50,00

32.5.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95 ⁰ С
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.6. Метод количественного определения кукурузы линии Bt 11

32.6.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1 (*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы и области ДНК, специфичной трансформационному событию Bt 11, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы 0,1, 0,3, 0,7, 1,0, 1,3, 2,0;

32.6.2. Праймеры на ген *adh1 1*:

5' CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC 3' (праймер 1),

5' CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC 3' (праймер 2),

5'-FAM-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA –TAMRA-3' (праймер 3).

32.6.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA 3' (праймер 4),

5' TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG 3' (праймер 5),

5' -FAM –AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA -TAMRA-3' (праймер 6).

32.6.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 250 нг)	6,000
Деионизированная вода	9,000
Праймеры 1,2 (20 мкМ)	0,375 каждого
Праймер 3 (10 мкМ)	0,500
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (10млМ)	0,500 каждого
dUTP (20 млМ)	0,500
Буфер для ПЦР 10 X	2,500
MgCl ₂ раствор (25 млМ)	4,000
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,250
Итого:	25,000

32.6.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	6,0000
Деионизированная вода	7,7500
Праймеры 4,5 (20 мкМ)	0,9375 каждого
Праймер 6 (10 мкМ)	0,6250
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (10 млМ)	0,5000 каждого
dUTP (20 млМ)	0,5000
Буфер для ПЦР 10 X	2,5000
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,0000
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,250
Итого:	25,0000

32.6.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.7. Метод количественного определения кукурузы линии Т 25

32.7.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1 (*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы и области ДНК, специфичной трансформационному событию Т 25, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы 0,15, 0,40, 0,90, 2,00, 3,3%;

32.7.2. Праймеры на ген *adh1 1*:

5' CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CCT 3' (праймер 1),

5' CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC 3' (праймер 2),

5'-FAM-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA –TAMRA-3' (праймер 3);

длина ампликона 136 пар нуклеотидов.

32.7.3. Праймеры на целевую последовательность ГМО:

5' ACA AGC GTG TCG TGC TCC AC 3' (праймер 4),
 5' GAC ATG ATA CTC CTT CCA CCG 3' (праймер 5),
 5' -FAM –TCA TTG AGT CGT TCC GCC ATT GTC G -TAMRA-3'
 (праймер 6);

длина ампликона 102 пары нуклеотидов.

32.7.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	5,00
Деионизированная вода	9,75
Праймеры 1,2 (10 мкМ)	0,50 каждого
Праймер 3 (10 мкМ)	0,50
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (10 млМ)	0,50 каждого
dUTP (20 млМ)	0,50
Буфер для ПЦР 10 X	2,50
MgCl ₂ раствор (25 млМ)	4,00
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Итого:	25,00

32.7.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	5,00
Деионизированная вода	8,75
Праймеры 4,5 (10 мкМ)	1,00 каждого
Праймер 6 (10 мкМ)	0,50
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (10 млМ)	0,50 каждого
dUTP (20 млМ)	0,50
Буфер для ПЦР 10 X	2,50
MgCl ₂ раствор (50 млМ)	4,00
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Итого:	25,00

32.7.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C

Отжиг 60 сек/60°C измерение

Количество циклов амплификации 45

32.8. Метод количественного определения кукурузы линии GA 21

32.8.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1 (*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы и области ДНК, специфичной трансформационному событию GA21, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы 0,1%, 0,49%, 0,98 %, 1,3 %, 1,71 %, 4,26 % .

32.8.2. Праймеры на ген *adh1 1*:

5' CCA GCC TCA TGG CCA AAG 3' (праймер 1),

5' CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG 3' (праймер 2),

5'-FAM-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT-TAMRA-3' (праймер 3);

длина ампликона 70 пар нуклеотидов.

32.8.3. Праймеры на целевую последовательность ГМО:

5' CTT ATC GTT ATG СТА TTT GCA ACT TTA GA 3' (праймер 4),

5' TGG CTC GCG ATC CTC CT 3' (праймер 5),

5' -FAM -CAT ATA СТА ACT CAT ATC TCT TTC TCA ACA GCA GGT GGG T -TAMRA-3' (праймер 6);

длина ампликона 112 пар нуклеотидов;

32.8.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 300 нг)	5,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР 10 X	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ раствор	5,00 ммоль/л
Праймеры 1,2	150,00 нмоль/л каждого
dUTP	400,00 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200,00 мкмоль/л каждого
Праймер 3	50,00 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 50,00 мкл

32.8.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 300 нг)	5,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР 10 X	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ раствор	5,00 ммоль/л
Праймеры 4,5	150,00 нмоль/л каждого
dUTP	400,00 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200,00 мкмоль/л каждого
Праймер 6	50,00 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 50,00 мкл

32.8.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.9. Метод количественного определения кукурузы линии MIR 604

32.9.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1 (*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы и области ДНК, специфичной трансформационному событию MIR 604, на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM и VIC; -для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава и свойств генетически модифицированной кукурузы менее 0,09%, 0,1%, 0,98 %, 9,85 %;

32.9.2. Праймеры на ген *adh1 1*:

5' CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC 3' (праймер 1),

5' CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC 3' (праймер 2),

5'-VIC-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA –TAMRA-3'
(праймер 3);

длина ампликона 136 пар нуклеотидов.

32.9.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' GCG CAC GCA ATT CAA CAG 3' (праймер 4),

5' GGT CAT AAC GTG ACT CCC TTA ATT CT 3' (праймер 5),

5' -FAM –AGG CGG GAA ACG ACA ATC TGA TCA TG-TAMRA-3'
(праймер 6);

длина ампликона 76 пар нуклеотидов.

32.9.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК кукурузы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 250 нг)	5,00
Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР 10 X	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ раствор	5,00 ммоль/л
Праймеры 1,2	300 нмоль/л каждого
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого
Праймер 3	200 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 25,00 мкл

32.9.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	5,00
Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР 10 X	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ раствор	5 ммоль/л
Праймер 4	600 нмоль/л
Праймер 5	300 нмоль/л
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого
Праймер 6	200 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 25,00 мкл

32.9.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
--------	------------------------

Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	40

32.10. Метод количественного определения риса линии LL 62

32.10.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез фосфолипазы Д (*PLD*), присущей для всех линий риса, и области ДНК, специфичной трансформационному событию LL 62, на границе генома риса и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированного риса менее 0,09%, 0,45%, 0,9 %, 1,8 %, 3,6 %.

32.10.2. Праймеры на ген *PLD*:

5' TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT 3' (праймер 1),

5' CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTC C 3' (праймер 2),

5'-FAM –TGT TGT GCT GCC AAT GTG GCC TG –TAMRA-3' (праймер 3);

длина ампликона 64 пары нуклеотидов.

32.10.3. Праймеры на целевую последовательность ГМО:

5' AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG G 3' (праймер 4),

5' TGC TAA CGG GTG CAT CGT CTA 3' (праймер 5),

5' -FAM –CGC ACC GAT TAT TTA TAC TTT TAG TCC ACC-TAMRA-3' (праймер 6);

длина ампликона 88 пар нуклеотидов.

32.10.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК риса:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	5,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР 10 X	5,00

	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ раствор	5 ммоль/л
Праймеры 1,2. (10 мкМ)	200 нмоль/л каждого
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого
Праймер 3 (10 мкМ)	200 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 25,00 мкл

32.10.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	5,00
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Буфер для ПЦР 10 X	5,00

	Концентрация в реакционной смеси
MgCl ₂ раствор	5 ммоль/л
Праймер 4,5 (10 мкМ)	400 нмоль/л
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого
Праймер 6 (10 мкМ)	200 нмоль/л
Деионизированная вода	довести до 25,00 мкл

32.10.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период	2 мин/ 50°C
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.11. Метод количественного определения сахарной свеклы линии Н7-1

32.11.1. Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез глутамин синтетазы (*GS*), присущей для всех линий сахарной свеклы и области ДНК, специфичной

трансформационному событию Н7-1, на границе генома сахарной свеклы и элемента генетической конструкции; используются зонды, меченые красителем FAM; для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава генетически модифицированной сахарной свеклы менее 0,1%, 0,5%, 0,9 %, 2,0 %, 5,0 %.

32.11.2. Праймеры на ген *GS* :

5' GAC CTC CAT ATT ACT GAA AGG AAG 3' (праймер 1),

5' GAG TAA TTG CTC CAT CCT GTT CA 3' (праймер 2),

5'-FAM –CTA CGA AGT TTA AAG TAT GTG CCG CTC –TAMRA-3' (праймер 3);

длина ампликона 121 пара нуклеотидов.

32.11.3. Праймеры на целевую последовательность ГМИ:

5' TGG GAT CTG GGT GGC TCT AAC T 3' (праймер 4),

5' AAT GCT GCT AAA TCC TGA G 3' (праймер 5),

5' -FAM –AAG GCG GGA AAC GAC AAT CT- TAMRA-3' (праймер 6);

длина ампликона 110 пар нуклеотидов;

32.11.4. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение ДНК сахарной свеклы:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 125 нг)	5,0000
Деионизированная вода	9,2000
Праймеры 1,2 (100 мкМ)	0,0375 каждого
Праймер 3 (100 мкМ)	0,0250
dUTP (20 млМ)	0,5000
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (10 млМ)	0,5000 каждого
Буфер для ПЦР 10 X	2,5000
MgCl ₂ раствор (25 млМ)	5,0000
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,2000
Краситель ROX (25 мкМ)	1,0000
Итого	25,0000

32.11.5. Реакционная смесь для проведения ПЦР, количественное определение рекомбинантной ДНК:

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 125 нг)	5,0000
Деионизированная вода	7,0750
Праймеры 4,5 (100 мкМ)	0,1000 каждого
Праймер 6 (100 мкМ)	0,0250

dUTP (20 млМ)	0,5000
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP (10 млМ)	0,5000 каждого
Буфер для ПЦР 10 X	2,5000
MgCl ₂ раствор (25 млМ)	7,0000
Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,2000
Краситель ROX (25 мкМ)	1,0000
Итого:	25,0000

32.11.6. Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация первичная	10 мин/ 95°C
Амплификация	
Денатурация	15 сек/95°C
Отжиг	60 сек/60°C измерение
Количество циклов амплификации	45

32.12. Допускается использование коммерческих тест-систем отечественного и зарубежного производства, разрешенных для применения в установленном порядке, в соответствии с инструкцией изготовителя. При выборе коммерческих тест-систем необходимо учитывать их совместимость с тест-системами, используемыми для выделения ДНК, а также с имеющимся оборудованием.

ГЛАВА 9

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ В ЛАБОРАТОРИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ

33. Исследования по идентификации ГМИ растительного происхождения проводят на базе аккредитованных лабораторий, организованных в соответствии с Инструкцией по применению «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)» (регистрационный номер 09-1008), устанавливающей санитарно-гигиенические и противоэпидемические требования к устройству, оборудованию и эксплуатации лабораторий, использующих метод полимеразной цепной реакции в различных модификациях.

34. Соблюдение данных требований позволит снизить риск контаминации, получения ложноположительных результатов и обеспечить получение достоверных результатов ПЦР-исследований.

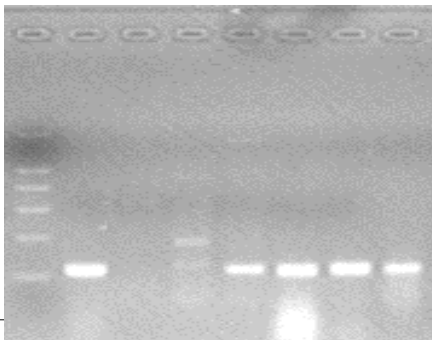
35. К возможным источникам загрязнения, влияющим на проведение реакции, относятся:

перекрестное загрязнение образцов (в процессе отбора, пробоподготовки);
загрязнение продуктами амплификации предыдущих реакций;
положительный контроль (клонированная ДНК или сырье).

Приложение 1
к инструкции по применению «Методы
идентификации и количественного
определения генно-инженерных
модифицированных организмов
растительного происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации ДНК сои (ген лектина)

Продукт ПЦР -118 пар нуклеотидов



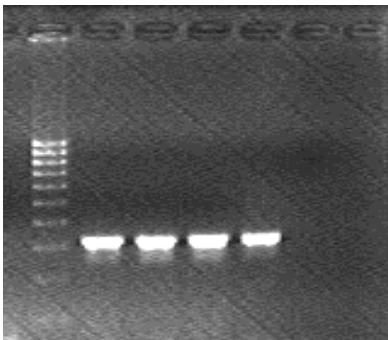
1 2 3 4 5 6 7

- 1 – маркер молекулярной массы (100 п.н., Лаборатория Био-Рад).
- 2 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из семян нетрансгенной сои.
- 3 – контроль качества реакционной смеси – ПЦР в отсутствие матричной ДНК.
- 4-7 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из продуктов переработки сои.

Приложение 2
к инструкции по применению «Методы
идентификации и количественного
определения генно-инженерных
модифицированных организмов
растительного происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации ДНК кукурузы (ген зеина).

Продукт ПЦР -329 пар нуклеотидов



1 2 3 4 5 6

1 – маркер молекулярной массы (100 п.н., Лаборатория Био-Рад).

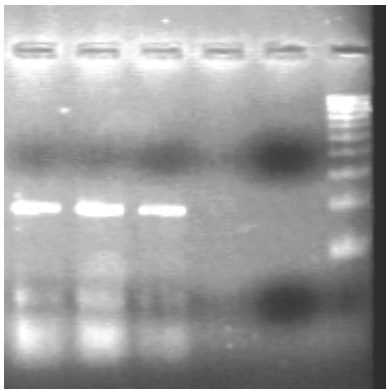
2-5 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян нетрансгенной кукурузы.

6 – контроль качества реакционной смеси – ПЦР в отсутствие матричной ДНК.

Приложение 3
к инструкции по применению «Методы
идентификации и количественного
определения генно-инженерных
модифицированных организмов
растительного происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации рекомбинантной ДНК (35S промотор)

Продукт ПЦР -195 пар нуклеотидов.



1 2 3 4 5 6

1-3 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян сои линии 40-3-2 .

4 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян нетрансгенной сои.

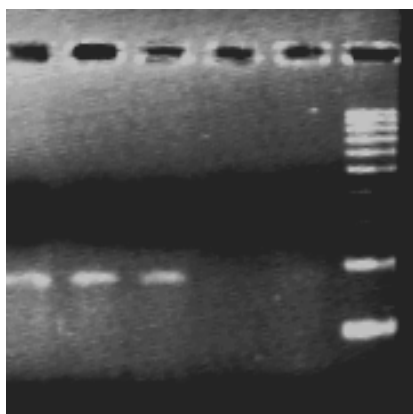
5 – контроль качества реакционной смеси – ПЦР в отсутствие матричной ДНК.

6 – маркер молекулярной массы (100 п.н., Лаборатория Био-Рад).

Приложение 4
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации рекомбинантной ДНК (NOS терминатор)

Продукт ПЦР -180 пар нуклеотидов.



1 2 3 4 5 6

1-3 –продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян сои линии 40-3-2.

4 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян нетрансгенной сои.

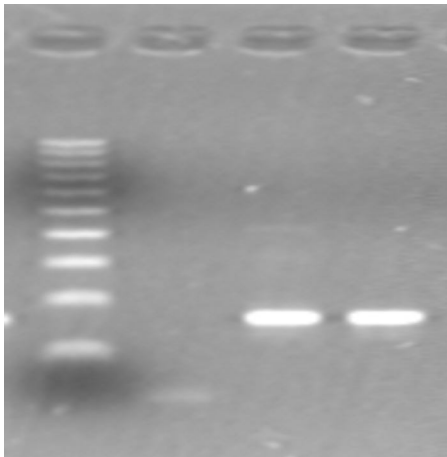
5 – контроль качества реакционной смеси – ПЦР в отсутствие матричной ДНК.

6 – маркер молекулярной массы (100 п.н., Лаборатория Био-Рад).

Приложение 5
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для генетической конструкции сои линии 40-3-2

Продукт ПЦР -169 пар нуклеотидов.



1 2 3 4

1 – маркер молекулярной массы (100 п.н., Лаборатория Био-Рад).

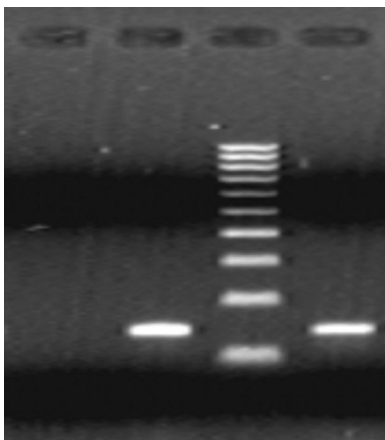
2 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян нетрансгенной сои.

3,4 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян сои линии 40-3-2.

Приложение 6
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для генетической
конструкции кукурузы линии MON 810

Продукт ПЦР -149 пар нуклеотидов.



1 2 3 4

1 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из зерна нетрансгенной кукурузы.

2 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из зерна кукурузы линии MON 810.

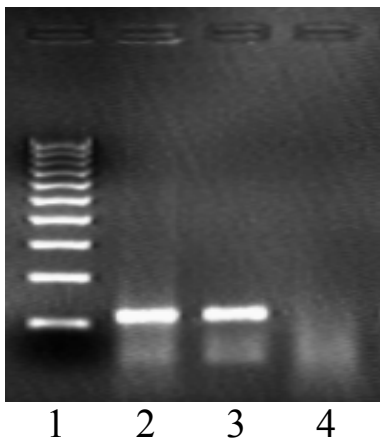
3 – маркер молекулярной массы (100 п.н., лаборатория Био-Рад).

4 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из зерна кукурузы линии MON 810.

Приложение 7
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для сахарной
свеклы линии Н7-1

Продукт ПЦР -110 пар нуклеотидов.

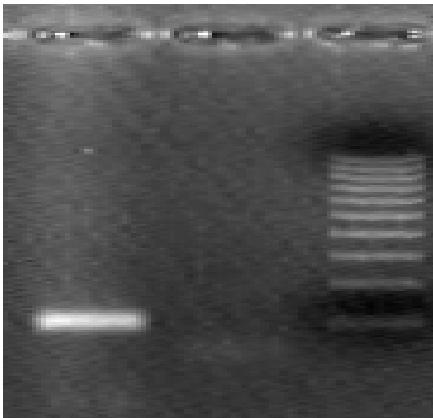


1 – маркер молекулярной массы (100 п.н., лаборатория Био-Рад);
2, 3 – продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из корнеплодов
сахарной свеклы линии Н7-1.
4 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из корнеплодов
нетрансгенной сахарной свеклы.

Приложение 8
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам
идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для риса,
устойчивого к глюфосинату аммония, линии LL 62

Продукт ПЦР -88 пар нуклеотидов.



1 2 3

1 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из семян риса линии LL 62.

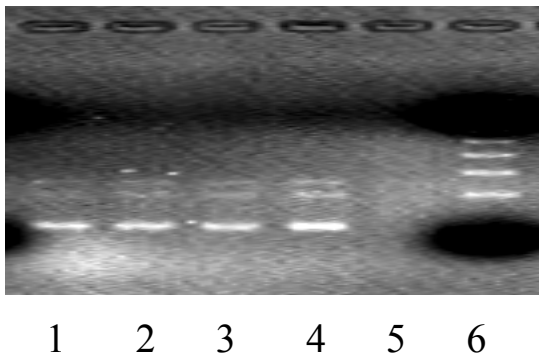
2 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из семян нетрансгенного риса.

3 – маркер молекулярной массы (100 п.н., лаборатория Био-Рад).

Приложение 9
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для сортов картофеля, устойчивых к колорадскому жуку (ассорт Бурбанк Ньюлиф, Супериор Ньюлиф, Елизавета 2904/kgs, Луговской 1210 амк)

Продукт ПЦР -102 пар нуклеотидов.



- 1 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из клубней картофеля сорта ассорт Бурбанк Ньюлиф.
- 2 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из клубней картофеля сорта Супериор Ньюлиф.
- 3 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из клубней картофеля сорта Елизавета 2904/kgs.
- 4 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из клубней картофеля сорта Луговской 1210 амк.
- 5 – продукт ПЦР, полученный на препаратах ДНК из клубней нетрансгенного картофеля .
- 6 – маркер молекулярной массы (100 п.н. лаборатория Био-Рад).

Приложение 10
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Анализ результатов определения генетически модифицированной сои

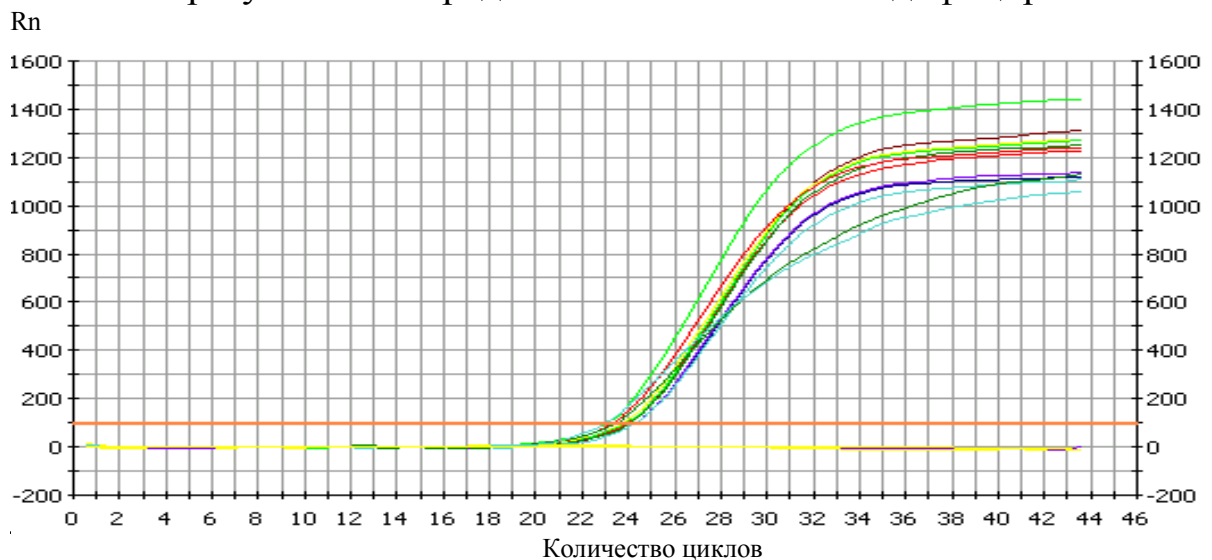


Рисунок 1 – Зависимость величины сигнала флуоресценции (R_n) от количества циклов ПЦР для гена лектина.

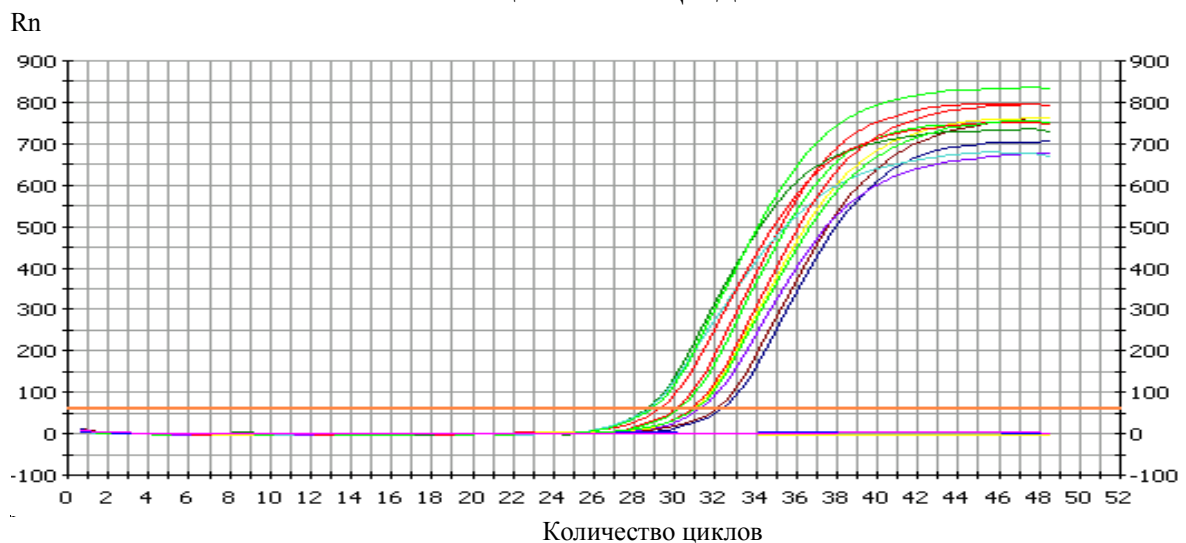


Рисунок 2 – Зависимость величины сигнала флуоресценции (R_n) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК (35 S промотор).

Расчет количества рекомбинантной ДНК.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t).

По кривой амплификации определяют пороговый цикл для каждой реакции. Рассчитывают разность между величинами C_t , полученными для 35S промотора и для гена лектина. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяют по формуле:

$$w = 2^{-(\Delta C_t \text{ sam} - \Delta C_t \text{ ref})} \times c \text{ ref} \quad (1)$$

Где:

$\Delta C_t \text{ sam}$ - разность между значениями C_t для 35 S промотора и гена лектина в исследуемом образце.

$\Delta C_t \text{ ref}$ – разность между значениями C_t для 35 S промотора и гена лектина в стандартном образце.

$C \text{ ref}$ – концентрация стандартного образца.

Приложение 11
к инструкции по применению
«Методы идентификации и
количественного определения генно-
инженерных модифицированных
организмов растительного
происхождения»

Анализ результатов определения генетически модифицированной
кукурузы

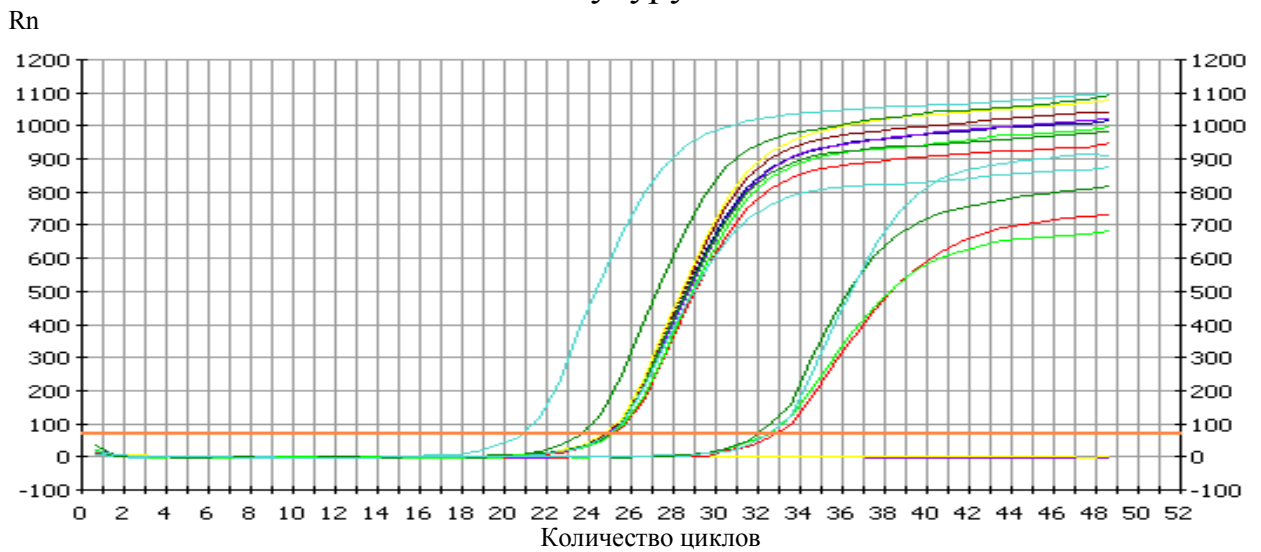


Рисунок 3 – Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для гена инвертазы.

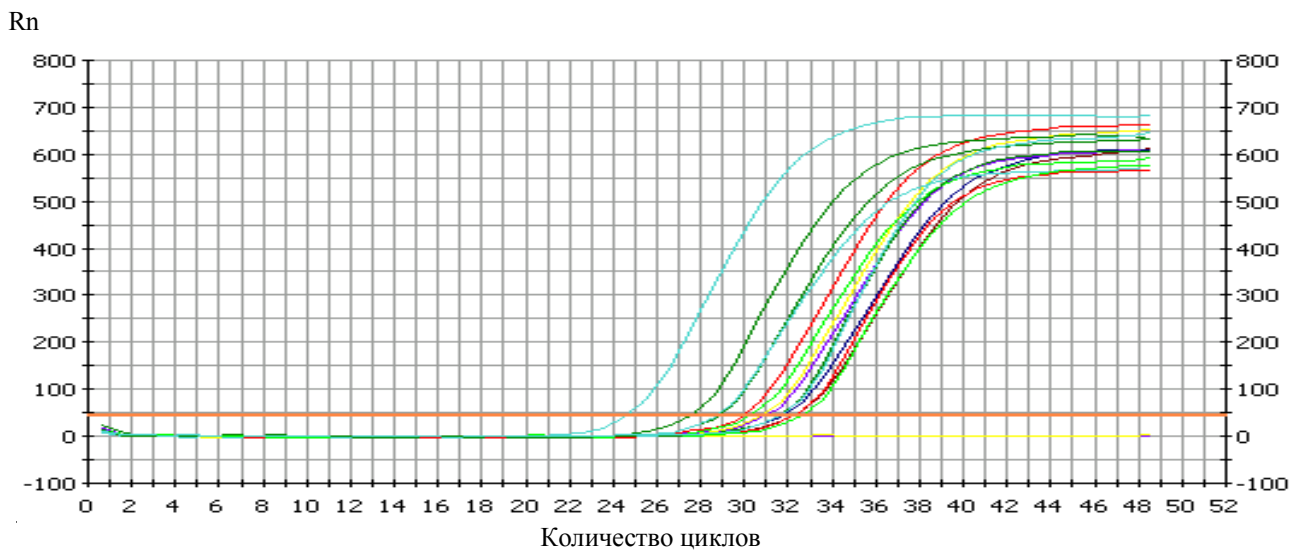


Рисунок 4 – Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК (35 S промотор).

Расчет количества рекомбинантной ДНК.

Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла C_t).

По кривой амплификации определяют пороговый цикл для каждой реакции. Рассчитывают разность между C_t специфичным для 35 S промотора и C_t специфичным для гена инвертазы. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяется по формуле:

$$w = 2^{-(\Delta C_t \text{ sam} - \Delta C_t \text{ ref})} \times c \text{ ref} \quad (2)$$

Где:

$\Delta C_t \text{ sam}$ – разность между значениями C_t для 35 S промотора и гена инвертазы в исследуемом образце.

$\Delta C_t \text{ ref}$ – разность между значениями C_t для 35 S промотора и гена инвертазы в стандартном образце.

$C \text{ ref}$ – концентрация стандартного образца.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция по применению
«Методы идентификации и количественного определения генно-
инженерных модифицированных организмов растительного
происхождения»

	стр.
Глава 1 Область применения.....	2
Глава 2 Общие положения.....	2
Глава 3 Аппаратура, инструменты, лабораторная посуда, реактивы.....	3
Глава 4 Отбор, хранение и подготовка проб пищевых продуктов для анализа	5
Глава 5 Подготовка к анализу.....	6
Глава 6 Выделение ДНК.....	8
Глава 7 Метод ПЦР с электрофоретической детекцией.....	10
Глава 8 Метод ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.....	31
Глава 9 Организация работ в лаборатории при проведении ПЦР-исследований	50
Приложение 1 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации ДНК сои (ген лектина).....	52
Приложение 2 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации ДНК кукурузы (ген зеина)....	53
Приложение 3 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК (35S промотор).....	54
Приложение 4 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК (NOS терминатор).....	55
Приложение 5 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для генетической конструкции сои линии 40-3-2	56
Приложение 6 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для генетической конструкции кукурузы линии MON 810.....	57
Приложение 7 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для сахарной свеклы линии Н7-1.....	58

Приложение 8 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для риса, устойчивого к глюфосинату аммония, линии LL 62	59
Приложение 9 Пример представления данных электрофореза по результатам идентификации рекомбинантной ДНК, характерной для сортов картофеля, устойчивых к колорадскому жуку (Рассет Бурбанк Ньюлив, Суперитор Ньюлив, Елизавета 2904/kgs, Луговской 1210 amk).....	60
Приложение 10 Анализ результатов определения генетически модифицированной сои	61
Приложение 11 Анализ результатов определения генетически модифицированной кукурузы.....	63

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция разработана специалистами Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (В.П. Филонов, И.А. Застенская, Е.В., Е.А.Федоренко, Л.А. Мельникова, Т.С. Трешкова),

2. Утверждена заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 2009 г., регистрационный №.

3. Введена впервые.