

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ В.И. Качан
19 марта 2010 г.
Регистрационный № 069-0210

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.П. Филонов, канд. мед. наук, доц. И.П. Щербинская, канд. биол. наук Л.А. Мельникова, Т.С. Трешкова, канд. мед. наук, доц. Т.И. Сероокая

Минск 2010

ГЛАВА 1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Методы определения генетически модифицированных источников растительного происхождения в пищевых продуктах» (далее — Инструкция) устанавливает методы идентификации и количественного определения генетически модифицированных источников (далее — ГМИ) растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье.

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

ГЛАВА 2. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция представляет скрининговые методы, основанные на полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР), направленные на идентификацию референсной последовательности генома, свидетельствующей о наличии в анализируемом образце пищевого продукта искомого растительного компонента и регуляторных последовательностей (промотор и/или терминатор), указывающих на присутствие ГМИ.

2. Анализ пищевых продуктов и продовольственного сырья на наличие ГМИ включает на первом этапе качественное определение (идентификация рекомбинантной ДНК). При получении положительного результата определяют количественное содержание ГМ-компонента в образце (%).

3. Представленные методы анализа с использованием ПЦР включают следующие этапы:

- выделение ДНК;
- приготовление реакционной смеси;
- амплификация специфических фрагментов ДНК;
- детекция продуктов амплификации.

4. На стадии выделения ДНК исследуемый образец подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, благодаря чему получают раствор ДНК, свободной от ингибиторов и готовый для дальнейшей амплификации.

Специфические характеристики анализируемого образца и его обработка могут влиять на количество и качество полученной ДНК.

5. На стадии амплификации происходит накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для дальнейшей детекции.

• Для проведения амплификации необходимы следующие компоненты: пара олигонуклеотидных праймеров; дезоксинуклеотидтрифосфаты (далее — дНТФ); фермент Taq-ДНК-полимераза, ионы магния (Mg^{2+}); буферный раствор.

- Праймеры представляют собой синтетические олигонуклеотиды, длиной 20–30 пар оснований, комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента.

- Дезоксинуклеотидтрифосфаты являются материалом для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

- Фермент Таq-ДНК-полимераза — термостабильная ДНК-полимераза, катализирующая удлинение цепей праймеров путем последовательного присоединения нуклеотидных оснований к синтезируемой цепи ДНК.

- Ионы магния (Mg^{2+}) необходимы для поддержания активности фермента Таq-ДНК-полимеразы.

- Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен Трис-НСl-буфер, который удерживает рН реакции во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента.

- Каждый цикл амплификации включает три этапа, протекающие в различных температурных режимах.

- Денатурация ДНК (расплетение двойной спирали молекулы). Протекает при 93–95 °С в течение 30–40 с.

- Присоединение праймеров (отжиг). Отжиг праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах специфического участка. Происходит при температуре 50–65 °С в течение 20–60 с.

- Достаивание цепей ДНК (элонгация). Комплементарное достаивание цепей ДНК происходит в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Происходит при температуре 70–72 °С в течение 20–40 с.

- Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК являются матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК, служащего в свою очередь матрицей для синтеза новых цепей и т. д. Процесс проводят в специальном программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе автоматически осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.

6. В настоящей Инструкции представлены следующие способы детекции продуктов амплификации:

- электрофоретическая детекция в агарозном геле;
- гибридационно-флуоресцентная детекция в режиме реального времени;
- гибридизация на биологическом микрочипе.

ГЛАВА 3. АППАРАТУРА, ИНСТРУМЕНТЫ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА, РЕАКТИВЫ

1. Для идентификации и количественного определения ГМИ растительного происхождения используется следующая аппаратура и инструменты:

- амплификатор с соответствующим программным обеспечением;
- ПЦР боксы с бактерицидной лампой или ламинарные шкафы (по одному для этапа выделения ДНК и этапа приготовления реакционной смеси);
- комплекс аппаратно-программный для анализа биологических микрочипов (при детекции продуктов амплификации гибридизацией на биологическом микрочипе);
- прибор для горизонтального электрофореза с комплектом кювет и гребенок (при электрофоретической детекции продуктов амплификации);
- видеосистема, предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминесцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием; чувствительность — не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию) (при электрофоретической детекции продуктов амплификации);
- вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- источник напряжения с диапазоном регулируемого напряжения 50–300 В;
- холодильник бытовой с температурой морозильной камеры -20 °С;
- аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения 250–3000 мин⁻¹ (по одному для этапа выделения ДНК и этапа приготовления реакционной смеси);
- микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 13000 мин⁻¹);
- термостат под пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, диапазон температур от 15 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 электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью ±0,5 °С С, ТУ 64-1-1382-72 (при детекции продуктов амплификации гибридизацией на биологическом микрочипе);
- печь микроволновая (мощностью не менее 400 Вт);
- анализатор потенциометрический (рН-метр), погрешность измерений рН±0,01;
- гомогенизатор;
- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;
- облучатель бактерицидный настенный;

- дозаторы с переменным объемом дозирования: 0,2–2,0 мкл с шагом 0,01 мкл и точностью $\pm 1,2\%$; 0,5–10 мкл с шагом 0,01 мкл и точностью $\pm 0,8\%$; 2–20 мкл с шагом 0,01 мкл и точностью $\pm 0,8\%$; 20–200 мкл с шагом 0,1 мкл, с точностью $\pm 0,6\%$; 100–1000 мкл с шагом 1 мкл и точностью $\pm 3\%$; 2–10 мл с шагом 0,1 мл и точностью $\pm 0,5\%$ (по одному набору для этапа выделения ДНК и этапа приготовления реакционной смеси);

- пинцет медицинский по ГОСТ 21241-89;
- ножницы медицинские по ГОСТ 21239-93;
- скальпель медицинский по ГОСТ 21240-89.

2. Для проведения идентификации и количественного определения ГМИ растительного происхождения используется следующая лабораторная посуда:

- ступки фарфоровые по ГОСТ 9147-80;
- цилиндры мерные лабораторные вместимостью 10, 25, 100 и 1000 мл по ГОСТ 1770-74;
- колбы мерные лабораторные вместимостью 25, 50, 100, 250 и 1000 мл по ГОСТ 25336-82;
- пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 мл;
- наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10, 20, 200 и 1000 мкл; 10 мл;
- штативы для микроцентрифужных пробирок типа Эппендорф;
- штативы для дозаторов.

3. Проведение идентификации и количественного определения ГМИ растительного происхождения используются следующие реактивы:

- термостабильный фермент Таq-полимераза, оптимум работы в области 70–72 °С;
- фермент урацил-N-гликозилаза;
- буфер для ПЦР с $MgCl_2$;
- буфер для ПЦР без $MgCl_2$;
- маркер молекулярной массы ДНК;
- стандартный образец состава генетически немодифицированного организма растительного происхождения;
- стандартный образец состава ГМИ растительного происхождения;
- 2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (далее — dATP);
- 2'-дезокситидин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (далее — dCTP);
- 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (далее — dGTP);
- 2'-дезокситимидин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (далее — dTTP);

- 2'-деоксиурацил-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (далее — dUTP);
- праймеры синтезированные;
- 3%-й раствор перекиси водорода;
- кислота соляная;
- кислота борная;
- магний хлористый;
- натрий едкий;
- натрий хлористый;
- этилендиаминтетрауксусная кислота (далее — ЭДТА);
- гексадецилтриметиламмоний бромид (далее — СТАВ);
- Трис (оксиметил) аминометан;
- диаминобензидин (далее — ДАБ);
- альбумин бычий сывороточный сухой (далее — БСА);
- этидий бромистый;
- спирт этиловый;
- спирт изопропиловый;
- хлороформ;
- вода деионизированная;
- вода дистиллированная;
- 2-меркаптоэтанол;
- гуанидин тиоционат;
- N-[2-гидроксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфоновой кислоты] натриевая соль (HEPES);
- вазелиновое масло.

4. Допускается использование другой аппаратуры, инструментов и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных выше, разрешенных для применения в установленном порядке.

ГЛАВА 4. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Приготовление растворов для выделения ДНК:

Приготовление 1М Трис – HCl (pH 7,5):

- в мерной колбе на 100 мл растворяют 12,11 г Трис (оксиметил) аминометана в 80 мл дистиллированной воды, доводят pH концентрированной соляной кислотой до 7,5, а объем раствора — до метки деионизированной водой, перемешивают;
- срок хранения при температуре -20 °С — до 1 года.

Приготовление 5М NaCl:

- растворяют 29,22 г натрия хлористого в 100 мл дистиллированной воды, перемешивают;
- срок хранения в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года.

Приготовление 0,5 М ЭДТА (pH 8,0):

- в мерной колбе на 100 мл растворяют 18,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты в 80 мл дистиллированной воды, раствором 30%-й гидроокиси натрия доводят рН раствора до 8, а дистиллированной водой — объем раствора до метки, перемешивают;

- срок хранения в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре до 1 года.

Приготовление 2%-го лизирующего СТАВ-буфера с меркаптоэтанолом:

- растворяют 0,5 г гексадецилтриметиламмония бромида в 10 мл деионизированной воды, добавляют 2,5 мл 1М Трис – HCl, 7 мл 5М NaCl, 1 мл 0,5 М ЭДТА; доводят объем раствора деионизированной водой до 25 мл; перемешивают;

- срок хранения при температуре от 4 до 5 °С – не более 6 мес.;

- перед использованием раствор выдерживают при комнатной температуре или подогревают в термостате при температуре 65 °С до полного растворения осадка;

- непосредственно перед использованием в приготовленный лизирующий буфер вносят меркаптоэтанол из расчета 4 мкл на 1 мл лизирующего буфера, перемешивают.

Приготовление 30%-й NaOH:

- растворяют 3 г натрия гидроокиси в 7 мл дистиллированной воды;

- срок хранения в колбе с притертой пробкой при комнатной температуре — до 1 года.

Приготовление СТАВ-осаждающего буфера:

- в мерную колбу вносят 1 г СТАВ, 0,5 г NaCl, добавляют 100 мл деионизированной воды, доводят раствором 30%-й гидроокиси натрия рН раствора до 8, а объем деионизированной водой до 200 мл;

- срок хранения при 4 °С — не более 6 мес.

Приготовление 1,2 М NaCl:

- растворяют 7 г NaCl в 100 мл деионизированной воды, перемешивают;

- срок хранения при комнатной температуре в колбе с притертой пробкой — до 1 года.

Приготовление 70%-го раствора этилового спирта:

- смешивают 70 мл 96%-го этилового спирта с 26 мл деионизированной воды;

- срок хранения при температуре от 4 до 5 °С — не более 2 мес.

2. Приготовление растворов для проведения анализа методом ПЦР с электрофоретической детекцией

Приготовление реакционной смеси для амплификации референсной последовательности сои (ген лектина):

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): 5'GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C 3'	6,25
Праймер 2 (20 мкМ): 5'GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG 3'	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

Приготовление реакционной смеси для амплификации референсной последовательности кукурузы (ген зеина):

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): 5' TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG 3'	6,25
Праймер 2 (20 мкМ) 5' GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT 3'	6,25
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,30

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

Приготовление реакционной смеси для амплификации регуляторной последовательности ГМИ (35 S промотор):

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): 5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3'	7,0
Праймер 2 (20 мкМ): 5'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'	7,0
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	1,5

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

Приготовление реакционной смеси для амплификации регуляторной последовательности ГМИ (NOS терминатор):

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): 5' GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'	7,0

Праймер 2 (20 мкМ):

5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3' 7,0

Тақ-полимераза (5 единиц/мкл) 1,5

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

Приготовление раствора БСА (20,0 мкг/мл):

• растворяют 0,002 г сухого альбумина бычьего сывороточного в 1 мл деионизированной воды, 10 мкл полученного раствора смешивают с 990 мкл деионизированной воды;

• срок хранения в морозильной камере при температуре -20 °С — не более 6 мес.

Приготовление 1 x TBE буфера:

• в мерной колбе на 1000 мл растворяют 10,8 г Трис (оксиметил) аминметана, 5,5 г борной кислоты и 0,92 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения;

• срок хранения — 10 дней.

Приготовление раствора бромистого этидия (10 мг/мл):

• растворяют 1 г бромистого этидия в 100 мл дистиллированной воды;

• срок хранения в посуде темного стекла при температуре от 4 до 5 °С — 12 мес.

Приготовление 2% агарозного геля:

• 1 г агарозы добавляют в 50,мл 1×буфера TBE, тщательно перемешивают;

• полученный раствор помещают в микроволновую печь на 2–5 мин или кипятят на водяной бане 15 мин до полного расплавления агарозы;

• расплавленную агарозу охлаждают до 56 °С, добавляют 5 мкл бромистого этидия, тщательно перемешивают, разливают в подготовленную форму; толщина геля 0,5–0,7 см, через 30–40 мин удаляют гребенку;

• готовый гель используют сразу или хранят в 1xTBE буфере в холодильнике при 4 °С.

3. Приготовление растворов для проведения анализа методом ПЦР в режиме реального времени

Приготовление реакционной смеси для амплификации референсной последовательности soi (ген лектина):

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Урацил-N-гликозилаза (5 единиц/мкл)	0,1
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация
	в реакционной смеси
MgCl ₂	5 ммоль/л

Праймеры:	
5' TCC ACC CCC ATC CAC ATT T 3'	900 нмоль/л
5' GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA 3'	900 нмоль/л
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого
Праймер:	
5'-FAM-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG-TAMRA- 3'	100 нмоль/л
Деионизированная вода	Довести до 50,00 мкл

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

Приготовление реакционной смеси для амплификации регуляторной последовательности ГМИ (35S промотор):

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Урацил-N-гликозилаза (5 единиц/мкл)	0,1
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
	5 ммоль/л

MgCl ₂	
Праймеры:	
5'GCC TCT GCC GAC AGT GGT 3'	900 нмоль/л каждого
5' AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C 3'	900 нмоль/л каждого
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого
Праймер:	
5' –FAM –CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA-3'	100 нмоль/л
Деионизированная вода	Довести до 50,00 мкл

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

Приготовление реакционной смеси для амплификации референсной последовательности кукурузы (ген инвертазы):

Реактивы	Объем, мкл
Раствор целевой ДНК (максимальное количество ДНК 200 нг)	10,00
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
Урацил-N-гликозилаза (5 единиц/мкл)	0,1
Буфер для ПЦР без MgCl ₂ (10 X)	5,00
	Концентрация в реакционной смеси
	5 ммоль/л
MgCl ₂	
Праймеры:	

5' CAC TCC ATC GTG GAG AGC TT 3'	900 нмоль/л каждого
5' GGC GTT GTT GAA GAG GAA GA 3'	900 нмоль/л каждого
dUTP	400 мкмоль/л
Смесь нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP	200 мкмоль/л каждого

Праймер:

5'-FAM-TAC CCC ACA CGA GCC ATC TAC GAC T – TAMRA -3'	100 нмоль/л
---	-------------

Деионизированная вода

Довести до 50,00 мкл

• реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

4. Приготовление растворов для проведения анализа методом ПЦР с детекцией методом гибридизации на биологическом микрочипе

Приготовление гибридизационного буфера

В стеклянный стакан или плоскодонную колбу помещают точно отмеренные количества: 44,33 г гуанидинтиоцианата, 4,88 г N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновой кислоты] натриевой соли (HEPES). Затем приливают 3,75 мл раствора ЭДТА, добавляют 200 мл деионизированной воды. Емкость с раствором помещают до полного растворения компонентов. Доводят значение рН буфера до 7,5±0,1 добавлением раствора гидроокиси натрия. Полученный раствор помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем до метки деионизированной водой и разливают по 50 мл в плоскодонные колбы с притертыми пробками. Срок хранения при температуре 2–8 °С — не более 12 мес.

Приготовление реакционной смеси для амПЦР (из расчета на каждую анализируемую пробу)

Реактивы	Объем
Буфер для ПЦР с MgCl ₂	3,0 мкл
Смесь нуклеотидов (2 мМ)	3,0 мкл
Водный раствор праймеров в следующих концентрациях:	
35S: 5'ССТ ССТ CGG АТТ ССА ТТG ССС АG (23 нуклеотидных остатка — далее — н.о. — прямой, 5'GTC САТ СТТ ТGG GAC САС ТGT CGG (24 н.о.) — обратный, флуоресцентно-меченый;	15,32 нг/л
gus: 5'ААG ССG GGC ААТ ТGС ТGT GCC А (22 н.о.) — прямой;	3,75 нг/л
5'GAC СGС АТC GAA АСG СAG САС G (22 н.о.) — обратный, флуоресцентно-меченый;	37,59 нг/л
pos: 5'СGА ТGА СGС GGG АСА АGС СGT (21 н.о.) — прямой;	3,61 нг/л
5'GAC СТТ АGГ СGА СТТ ТТG ААС GCG С (25 н.о.) — обратный, флуоресцентно-меченый;	84,74 нг/л
npt: 5'GTG ТТC СGГ СТG ТСА GCG СAG G (22 н.о.) — прямой;	7,51 нг/л

5'CGC AAG GAA CGC CCG TCG TGG (21 н.о.) — обратный, флуоресцентно-меченый;	36,01 нг/л
ос: 5'GCG AGA CGC CTA TGA TCG CAT GAT (24 н.о.) — прямой;	8,18 нг/л
5'GAA ACC GGC GGT AAG GAT CTG AGC (24 н.о.) — обратный, флуоресцентно-меченый	41,41 нг/л
Тақ-полимераза (5 единиц/мкл)	2,5 мкл
Деионизированная вода	Довести до 27,0 мкл

- реакцию смесь перемешивают на вортекс, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Используют сразу после приготовления.

ГЛАВА 5. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА ПРОБ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

1. Отбор проб пищевых продуктов и продовольственного сырья для лабораторных исследований на наличие ГМИ производят согласно действующим ТНПА.

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

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

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

- Пробы продуктов консистенции крахмала весом 100–300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1 мл физиологического раствора. Для анализа необходимо 50–150 мкл образца.

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

- Из полученных гомогенатов и суспензий проводят выделение ДНК.

4. Образцы сырья и продуктов питания хранят не менее 1 мес. (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта. Образцы скоропортящихся продуктов хранят в замороженном состоянии (при температуре -20 °С) не менее 1 мес. (при необходимости повторного анализа).

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

ГЛАВА 6. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

1. Метод выделения ДНК с помощью СТАВ:

- навеску исследуемого гомогенизированного продукта массой 100 мг помещают в микроцентрифужную пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл;
- добавляют 300 мкл деионизированной воды, перемешивают шпателем;
- добавляют 500 мкл лизирующего 2% СТАВ-буфера с меркаптоэтанолом, тщательно перемешивают шпателем;
- инкубируют при 65 °С 60 мин;
- центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин;
- переносят 500 мкл супернатанта в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл;
- добавляют 500 мкл хлороформа, перемешивают на вортекс 30 с;
- центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин;
- переносят 500 мкл верхней фракции в чистую пробирку, добавляют 500 мкл хлороформа, перемешивают;
- центрифугируют 5 минут при 13000 об/мин;
- переносят верхнюю фракцию в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл, не захватывая слой хлороформа;
- добавляют 2 объема СТАВ-осаждающего буфера, перемешивают пипетированием;
- инкубируют 60 мин при комнатной температуре;
- центрифугируют 5 мин при 13000 об/мин;
- удаляют супернатант;
- растворяют осадок в 350 мкл NaCl (1,2 М);
- добавляют 350 мкл хлороформа, перемешивают на вортекс 30 с;
- центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин;
- переносят верхнюю фракцию в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл;
- добавляют 0,6 объема изопропилового спирта, перемешивают;
- центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин;
- удаляют супернатант;
- добавляют 500 мкл 70%-го раствора этилового спирта и перемешивают на вортекс;
- центрифугируют 10 мин при 13000 об/мин;
- удаляют супернатант;
- подсушивают осадок не более 5 мин при 65 °С для удаления капель спирта;
- растворяют осадок в 100 мкл деионизированной воды, осторожно встряхивая; полученный раствор ДНК готов для проведения полимеразной цепной реакции;
- хранят при -20 °С.

2. Допускается использование коммерческих тест-систем для выделения ДНК, разрешенных для применения в установленном порядке.

Выделение ДНК проводят строго в соответствии с инструкцией изготовителя.

ГЛАВА 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПЦР С ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

1. Сущность метода: электрофоретическая детекция продуктов амплификации основана на взаимодействии бромистого этидия с двухцепочечными фрагментами ДНК, в результате чего образуются соединения, флуоресцирующие под действием УФ-облучения. Это регистрируется в виде светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле.

Метод позволяет определить целевые (референсные и регуляторные) последовательности ДНК.

2. Идентификация ДНК сои (ген лектина)

Проведение анализа

Реакционную смесь для амплификации референсной последовательности сои (ген лектина) разливают в пробирки для проведения ПЦР по 24 мкл в каждую, добавляют 1 мкл раствора исследуемой ДНК в каждую пробирку, перемешивают, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин; при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавляют каплю вазелинового масла.

Условия амплификации:

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

После амплификации пробы готовы для выполнения электрофореза в агарозном геле; продукт амплификации — 118 пар нуклеотидов (далее — п.н.).

3. Идентификация ДНК кукурузы (ген зеина)

Проведение анализа

Реакционную смесь для амплификации референсной последовательности кукурузы (ген зеина) разливают в пробирки для проведения ПЦР по 24 мкл в каждую, добавляют 1 мкл раствора исследуемой ДНК в каждую пробирку, перемешивают, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин; при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавляют каплю вазелинового масла.

Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Денатурация	3 мин/95 °С
Амплификация	1 мин/94 °С
	1 мин/60 °С
	1 мин/72 °С

Количество циклов амплификации	40
Конечное удлинение	7 мин/72 °С
Фаза остывания	4 °С

После амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле; продукт амплификации — 329 п.н.

4. Идентификация 35S промотора вируса мозаики цветной капусты

Проведение анализа

Реакционную смесь для амплификации регуляторной последовательности ГМИ (35S промотор) разливают в пробирки для проведения ПЦР по 24 мкл в каждую, добавляют 1 мкл раствора исследуемой ДНК в каждую пробирку, перемешивают, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин; при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавляют каплю вазелинового масла.

Условия амплификации:

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

После амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле; продукт амплификации — 195 п.н.

5. Идентификация NOS терминатора из *Agrobacterium tumefaciens*

Проведение анализа

Реакционную смесь для амплификации регуляторной последовательности ГМИ (NOS терминатор) разливают в пробирки для проведения ПЦР по 24 мкл в каждую, добавляют 1 мкл раствора исследуемой ДНК в каждую пробирку, перемешивают, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин; при использовании амплификатора с крышкой без подогрева в каждую пробирку добавляют каплю вазелинового масла.

Условия амплификации:

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

После амплификации пробы готовы для проведения электрофореза в агарозном геле; продукт амплификации — 180 п.н.

6. Электрофорез в агарозном геле

В лунку 2% агарозного геля вносят 10 мкл реакционной смеси после амплификации, а в одну из лунок — маркер молекулярной массы ДНК.

Помещают заполненный гель в камеру для электрофореза с 1хТБЕ буфером, толщина слоя буфера над поверхностью геля 2–3 мм.

Выполняют электрофорез в режиме постоянного напряжения 100 В 70–90 мин.

Гель (без формы) помещают на экран трансиллюминатора.

Документируют результат электрофореза при помощи геледокументирующей системы, фотокопию геля прикладывают к отчету по идентификации.

7. Контроль результатов идентификации

Для повышения точности анализа рекомендуется использовать в работе отрицательные контроли — холостой опыт и раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически немодифицированного источника растительного происхождения.

Для контроля результатов идентификации используют положительный контроль — раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически модифицированного источника растительного происхождения.

Исследования должны выполняться не менее чем в двух повторностях.

8. Интерпретация результатов

Результаты исследования оценивают согласно приложениям 1–4.

Отсутствие в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 и 180 п.н. свидетельствует об отсутствии ГМИ в анализируемом образце.

Обнаружение в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 и 180 п.н. или одного из них свидетельствует о наличии ГМИ в анализируемом образце.

В случае выявления в одной из параллельно анализируемых проб и отсутствия в другой ПЦР-продуктов необходимо повторить весь анализ с еще одной навеской анализируемого продукта.

Обнаружение в отрицательных контролях ПЦР-продуктов размером 195 и 180 п.н. свидетельствует о получении ложноположительного результата. Это возможно при загрязнении ГМИ оборудования и/или реактивов. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и дозаторов раствором соляной кислоты (1 моль/л), заменить реактивы на свежеприготовленные, повторить амплификацию.

Отсутствие в положительном контроле ПЦР-продуктов размером 195 и 180 п.н. свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. Это возможно в случае потери активности одного из компонентов реакционной смеси для ПЦР. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить амплификацию.

9. При выполнении анализа методом ПЦР с электрофоретической детекцией допускается использование коммерческих тест-систем, разрешенных для применения в установленном порядке. Анализ проводят строго 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.

При использовании коммерческих тест-систем интерпретацию результатов проводят строго в соответствии с инструкцией производителя.

ГЛАВА 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

1. Сущность метода

При проведении анализа методом ПЦР в режиме реального времени регистрация продуктов амплификации происходит путем построения калибровочных кривых по реальным процессам, происходящим в каждой конкретной пробирке. В ходе реакции к образцу добавляется специальный зонд, модифицированный двумя флуоресцентными красителями, имеющими близкие максимумы поглощения и флуоресценции. Расстояние между молекулами красителей на зонде подобрано таким образом, что происходит перенос энергии от одной молекулы, испускающей первичный квант флуоресценции, к другой, которая испускает квант света в более длинноволновой области спектра. При наличии специфической матрицы в начале амплификации происходит смещение максимума флуоресценции из-за деградации олигонуклеотидного зонда и отменой переноса энергии от одного флуорофора к другому. Анализ кинетики флуоресценции позволяет рассчитать количество исходной матрицы, используемой в реакции амплификации (принцип Taqman).

2. Метод определения генетически модифицированной сои (далее — ГМ-сои)

Метод позволяет определить рекомбинантную ДНК, характерную для ГМ-сои

Анализ проводят по гену лектина, который присутствует в геноме сои, и регуляторной последовательности 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, содержащейся в геноме ГМ-сои.

Проведение анализа

Реакции для определения референсной последовательности сои (ген лектина) и регуляторной последовательности ГМИ (35S промотор) проводят в отдельных пробирках. Реакционные смеси для амплификации референсной последовательности сои (гена лектина) и регуляторной последовательности ГМИ (35S промотор) разливают в пробирки для проведения ПЦР, добавляют в каждую пробирку 10 мкл раствора ДНК, перемешивают, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Общий объем реакционной смеси составляет 50 мкл.

При исследовании используют стандартные образцы состава генетически модифицированной сои.

Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период (процедура деконтаминации)	2 мин/50 °С
Денатурация	10 мин/ 95 °С
Амплификация	15 с/95 °С, 60 с/60 °С измерение

3. Метод определения генетически модифицированной кукурузы (далее — ГМ-кукурузы)

Метод позволяет определить рекомбинантную ДНК, характерную для ГМ-кукурузы, в пищевых продуктах методом ПЦР в реальном времени.

Анализ проводят по гену инвертазы, который присутствует в геноме кукурузы, и регуляторной последовательности 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, находящегося в геноме всех генетически модифицированных линий кукурузы за исключением GA 21, LY 038, MIR 604.

Проведение анализа

Реакции для определения референсной последовательности кукурузы (ген инвертазы) и регуляторной последовательности ГМИ (35S промотор) должны проводиться в отдельных пробирках. Реакционные смеси для амплификации референсной последовательности кукурузы (ген инвертазы) и регуляторной последовательности ГМИ (35S промотор) разливают в пробирки для проведения ПЦР, добавляют в каждую пробирку 10 мкл раствора исследуемой ДНК, перемешивают, центрифугируют 30 с при 3000 об/мин. Общий объем реакционной смеси составляет 50 мкл.

Условия амплификации:

Стадия	Программа амплификации
Доамплификационный период (процедура деконтаминации)	2 мин/50 °С
Денатурация	10 мин/ 95 °С
Амплификация	15 с/95 °С, 60 с/60 °С измерение
Количество циклов амплификации	45

При исследовании используют стандартные образцы состава генетически модифицированной кукурузы.

4. Контроль результатов идентификации

Для повышения точности анализа рекомендуется использовать в работе отрицательные контроли – холостой опыт и раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически немодифицированного источника растительного происхождения.

Помимо этого, для контроля результатов идентификации используют положительный контроль — раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения.

Исследования должны выполняться не менее чем в двух повторностях.

5. Интерпретация результатов

Результаты исследования оценивают согласно приложениям 5–6.

Обнаружение в анализируемом образце пищевого продукта растительной ДНК (референсная последовательность) и отсутствие регуляторных последовательностей (промотор и/или терминатор)

свидетельствуют о наличии искомого растительного компонента и об отсутствии ГМИ. В этом случае исследования прекращают.

Выявление в анализируемом образце пищевого продукта регуляторных последовательностей (промотор и/или терминатор) свидетельствует о наличии ГМИ растительного происхождения. Исследование продолжают в случае необходимости определения количественного содержания ГМИ в представленном образце.

Получение в отрицательных контролях положительных сигналов свидетельствует о получении ложноположительного результата. Это возможно при загрязнении ГМИ оборудования и/или реактивов. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и дозаторов раствором соляной кислоты (1 моль/л), заменить реактивы на свежеприготовленные, повторить амплификацию.

Отсутствие сигнала в положительном контроле свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить амплификацию.

6. Допускается использование коммерческих тест-систем, 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.

При использовании коммерческих тест-систем интерпретацию результатов проводят строго в соответствии с инструкцией производителя.

ГЛАВА 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА МЕТОДОМ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ

1. Сущность метода

Метод основан на асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции (далее — амПЦР) с последующей гибридизацией продуктов на биологическом микрочипе. Метод одновременно устанавливает наличие или отсутствие в анализируемой пробе не менее пяти различных трансгенных последовательностей ДНК.

Биологический микрочип представляет собой стандартное предметное стекло для световой микроскопии, на поверхности которого в определенном порядке расположены микроскопические ячейки, заполненные полиакриламидным гелем. Схема биологического микрочипа представлена в приложении 7.

Проведение анализа

Реакционную смесь для амПЦР вносят в пробирки для проведения ПЦР по 27 мкл в каждую, добавляют 3 мкл раствора исследуемой ДНК.

При использовании амплификатора без подогрева крышки в каждую пробирку с реакционной смесью вносят по 30 мкл вазелинового масла для предохранения реакционной смеси от испарения водной фазы при амПЦР. В

этом случае анализируемую ДНК вносят под слой масла, в результате чего образуются водная и масляная фазы.

В две другие пробирки вносят по 3 мкл раствора заведомо трансгенной ДНК (положительный контроль) и заведомо нетрансгенной ДНК (отрицательный контроль).

Условия амплификации:

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации, с	Количество циклов
1)	95	300	1
2)	95	30	
	62	30	37
	72	30	
3)	72	300	1

После амплификации пробы готовы для осуществления гибридизации.

2. Гибридизация ДНК на биологическом микрочипе

В необходимое количество пробирок вносят по 24 мкл гибридизационного буфера. Добавляют по 12 мкл водной фазы ПЦР-смеси, полученной в результате проведения амПЦР и перемешивают в течение 20–30 с на вортекс для получения гибридизационной смеси.

Из каждой пробирки отбирают по 28 мкл гибридизационной смеси (для каждого биологического микрочипа) и помещают на поверхность биологического микрочипа через отверстие в пластиковой крышке. Гибридизацию проводят в термостате при температуре 37 °С в течение 18 ч.

После окончания гибридизации пластиковые крышки снимают, каждый биологический микрочип трижды промывают дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре.

3. Оценка результатов анализа

Визуализацию гибридизационной картины на биологическом микрочипе для анализируемой пробы осуществляют с помощью аппаратно-программного комплекса для анализа флуоресценции биологических микрочипов и компьютерной программы.

Полученную на экране компьютера гибридизационную картину для анализируемой пробы сравнивают с таковой для положительного контроля (заведомо трансгенной ДНК) и гибридизационной картиной для отрицательного контроля (заведомо нетрансгенной ДНК).

Наличие высокого уровня специфического флуоресцентного сигнала в гелевых ячейках биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды (для промотора 35S, терминатора pos, ocs, генов gus или npt II), свидетельствует о присутствии конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о трансгенности анализируемой ДНК.

Низкий уровень флуоресцентных сигналов в гелевых ячейках биологического микрочипа после гибридизации, сравнимый с уровнем фоновой флуоресценции отрицательного контроля, но не выше установленного порога чувствительности, указывает на отсутствие

конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о нетрансгенности анализируемой ДНК.

Высокий уровень флуоресценции одной, нескольких или всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, превышающий заданный порог чувствительности, свидетельствует о наличии ГМИ в анализируемом образце.

Низкий уровень флуоресценции всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, близкий к фоновой флуоресценции отрицательных контролей и не достигающий заданного в программе порога чувствительности, свидетельствует об отсутствии ГМИ в анализируемом продукте.

Высокий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо нетрансгенной ДНК свидетельствует о получении ложноположительного результата. Причиной может быть загрязнение ГМИ реактивов и/или оборудования. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и оборудования раствором соляной кислоты (1 моль/дм^3), заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Полученный при повторном анализе низкий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо нетрансгенной ДНК свидетельствует о достоверном результате, который является окончательным.

Низкий уровень (отсутствие) флуоресцентного сигнала при использовании заведомо трансгенной ДНК свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. Причиной могут быть потеря активности одного из компонентов реакционной смеси для амПЦР или несоблюдение условий проведения амПЦР и/или гибридизации на биологическом микрочипе. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Полученный при повторном анализе высокий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо трансгенной ДНК свидетельствует о достоверном результате, который является окончательным.

4. При проведении анализа методом ПЦР с детекцией результатов методом гибридизации на биологическом микрочипе допускается использование коммерческих тест-систем, разрешенных для применения в установленном порядке. Анализ проводят строго 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.

При использовании коммерческих тест-систем интерпретацию результатов проводят строго в соответствии с инструкцией производителя.

ГЛАВА 10. ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТ В ЛАБОРАТОРИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ

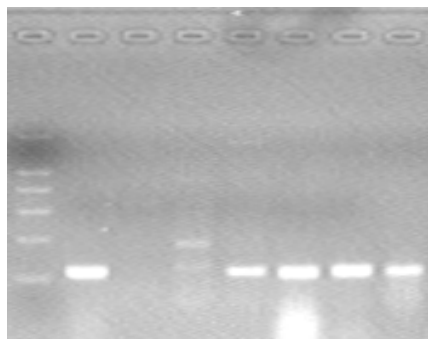
1. Исследования по идентификации ГМИ растительного происхождения проводят на базе аккредитованных лабораторий, организованных в соответствии с Инструкцией по применению «Организация работ в лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)» (регистрационный номер 090-1008 от 13.11.09), устанавливающей санитарно-гигиенические и противоэпидемические требования к устройству, оборудованию и эксплуатации лабораторий, использующих метод полимеразной цепной реакции в различных модификациях.

2. Соблюдение данных требований позволит снизить риск контаминации, получения ложноположительных результатов и обеспечить достоверность результатов ПЦР-исследований.

3. К возможным источникам загрязнения, влияющим на постановку реакции, относятся:

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

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

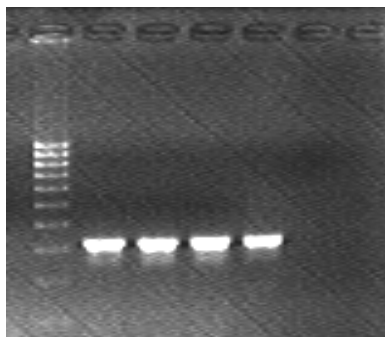


1 2 3 4 5 6 7

Продукт ПЦР — 118 пар нуклеотидов

- 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.

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

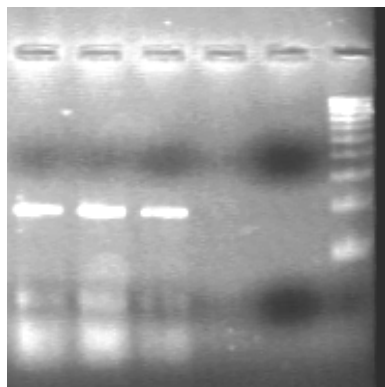


1 2 3 4 5 6

Продукт ПЦР — 329 пар нуклеотидов

- 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

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



1 2 3 4 5 6

Продукт ПЦР — 195 пар нуклеотидов

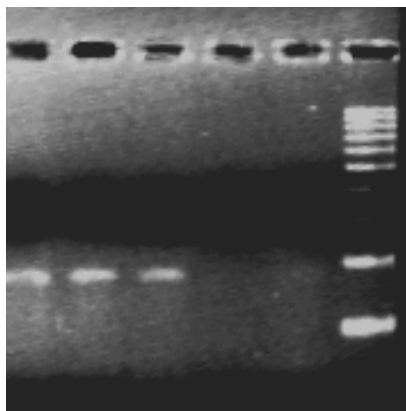
1–3 — продукты ПЦР, полученные на препаратах ДНК из семян сои линии 40–3–2

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)

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



1 2 3 4 5 6

Продукт ПЦР — 180 пар нуклеотидов

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)

Анализ результатов определения генетически модифицированной сои

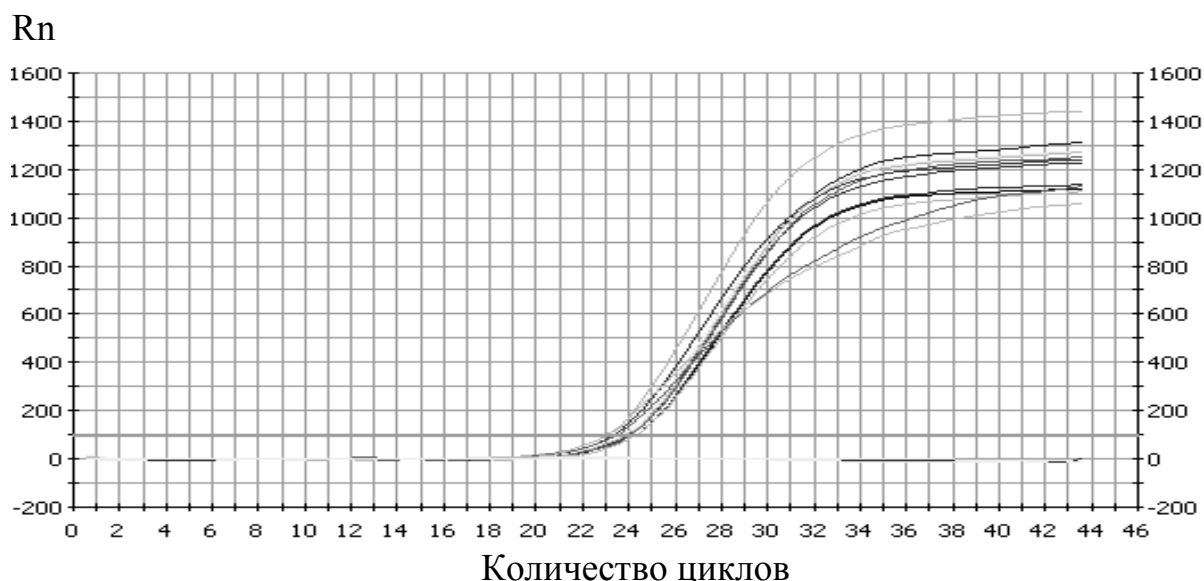


Рис. 1. Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для гена лектина

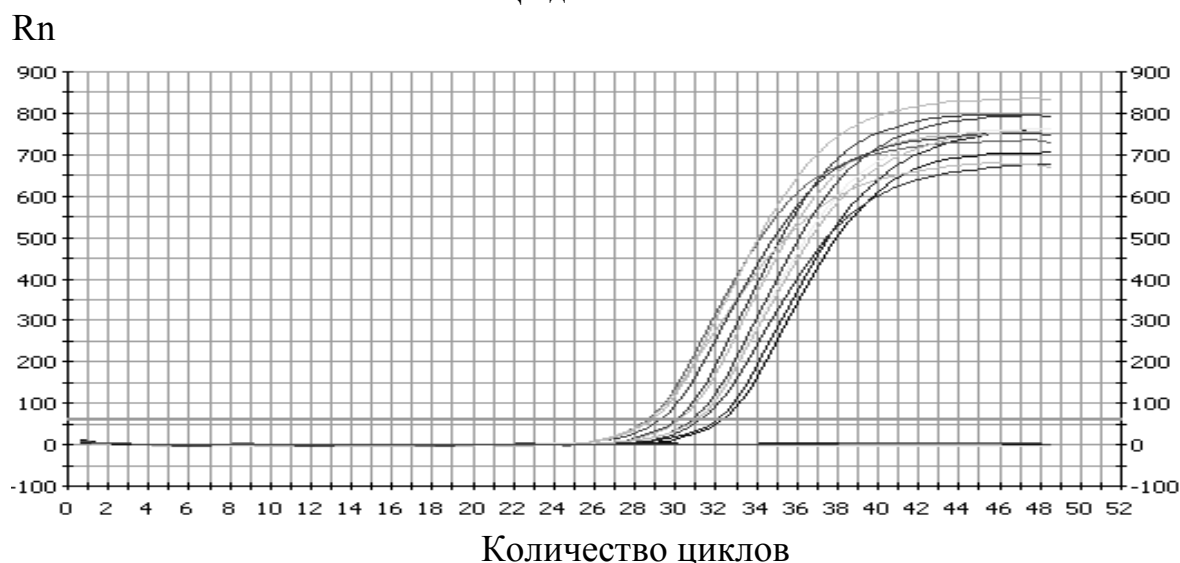


Рис. 2. Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК (35 S промотор)

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 величинами C_t , полученными для

35S промотора и для гена лектина. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяют по формуле:

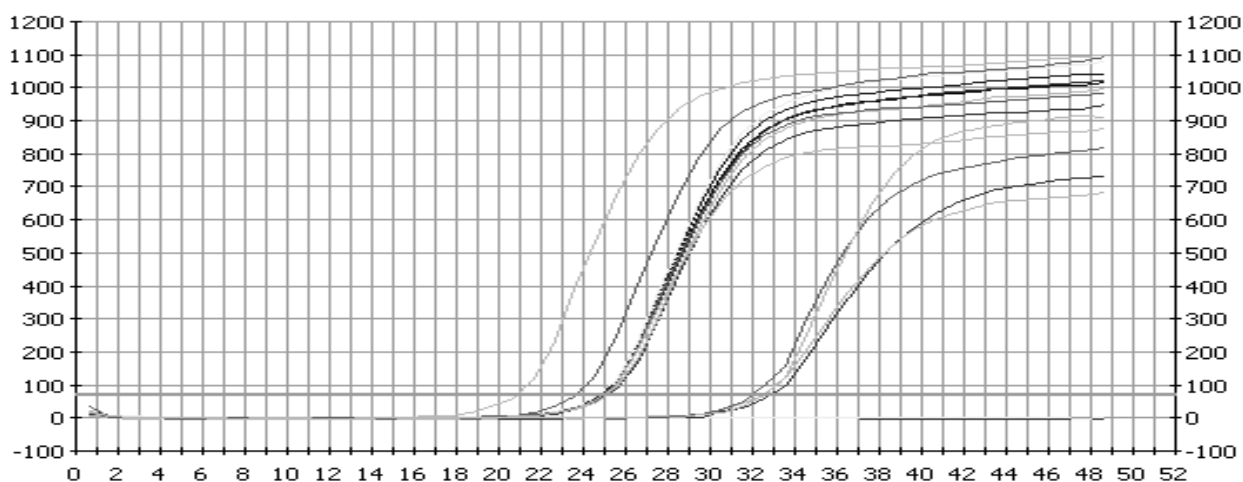
$$w = 2^{-(\Delta Ct_{sam} - \Delta Ct_{ref})} \times c_{ref}, \quad (1)$$

где ΔCt_{sam} — разность между значениями Ct для 35 S промотора и гена лектина в исследуемом образце;

ΔCt_{ref} — разность между значениями Ct для 35 S промотора и гена лектина в стандартном образце;

c_{ref} — концентрация стандартного образца.

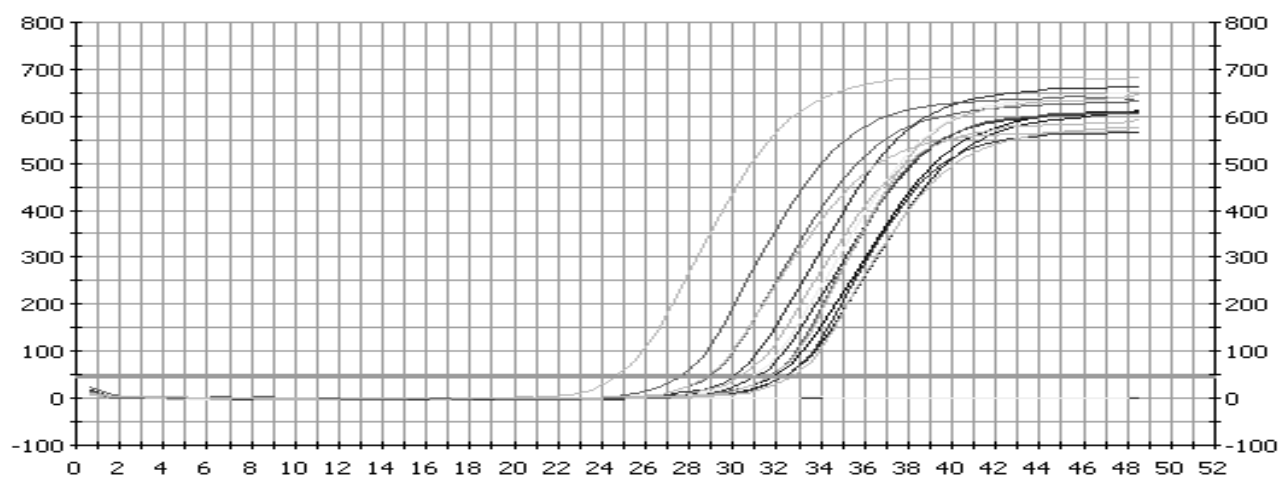
Анализ результатов определения генетически модифицированной кукурузы
Rn



Количество циклов

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

Rn



Количество циклов

Рис. 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:

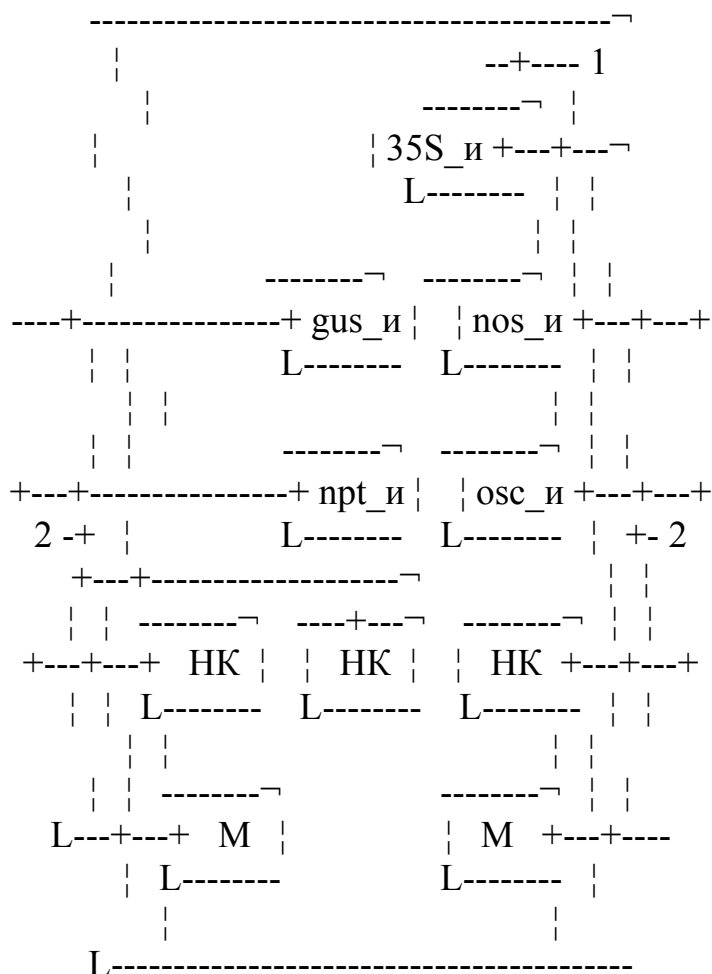
$$w = 2^{-(\Delta C_t \text{ sam} - \Delta C_t \text{ ref})} \times c \text{ ref}, \quad (2)$$

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.

Схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения



Примечания. 1 — предметное стекло; 2 — гелевые ячейки.

Каждая из пяти верхних ячеек содержит индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (35S, gus, nos, npt или osc).

Три ячейки с индексом «НК» не содержат ранее перечисленных индивидуальных ковалентно иммобилизованных олигонуклеотидов и выполняют роль отрицательного контроля гибридизации.

Две ячейки с индексом «М» содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для однозначной ориентации биологического микрочипа. Поверхность биологического микрочипа с ячейками должна быть закрыта пластиковой крышкой с отверстиями, которая вместе с предметным стеклом образует замкнутое пространство, предназначенное для проведения гибридизации анализируемой пробы.

Олигонуклеотиды, иммобилизованные на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Последовательность олигонуклеотидов
35S_и	промотор 35S	5'GCC ATC ATT GCG ATA AAG G
gus_и	ген gus	5'CTG GTA TCA GCG CGA A
nos_и	терминатор nos	5'GCT AAG CAC ATA CGT CAG AA
npt_и	ген npt II	5'GGC AGC GCG GCT ATC
ocs_и	терминатор ocs	5'TTC TGT TGT GCA CGT TGT A

Примечание. И — иммобилизованный.