



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE



Badanie próbek żywności na obecność Genetycznie Zmodyfikowanych Organizmów

Rozdział 9

Wykrywanie jakościowe kukurydzy MON810, kukurydzy Bt-176 i soi Roundup Ready® metodą PCR

M. Querci, M. Maretti, M. Mazzara

WORLD HEALTH ORGANIZATION
REGIONAL OFFICE FOR EUROPE

WELTGESUNDHEITSORGANISATION
REGIONALBÜRO FÜR EUROPA



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
BUREAU REGIONAL DE L'EUROPE

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ЕВРОПЕЙСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ БЮРО

Spis Treści

Rozdział 9

Wykrywanie jakościowe kukurydzy MON810, kukurydzy Bt-176 i soi Roundup Ready® metodą PCR

Badania	3
<i>Wstęp</i>	3
PCR specyficzny dla genu roślinnego: soja- <i>lektyna</i>	6
PCR specyficzny dla genu roślinnego: kukurydza- <i>zeina</i>	9
Screeningowe metody detekcji roślin GM	12
Wykrywanie promotora 35S	14
Wykrywanie terminatora <i>nos</i>	14
Specyficzna detekcja kukurydzy MON810, kukurydzy Bt-176 i soi Roundup Ready® metodą nested PCR	17
Wykrywanie kukurydzy MON810	17
Wykrywanie kukurydzy Bt-176	22
Wykrywanie soi Roundup Ready®	26

Badania

Wprowadzenie

Przedstawione protokoły bazują na metodzie PCR i pozwalają na screening GMO (stosując promotor 35S i terminator nos) oraz wykrywanie specyficznych GMO (soi Roundup Ready®, kukurydzy MON810 i kukurydzy Bt-176) w nieprzetworzonym i przetworzonym materiale, przez porównanie z odpowiednimi niezmodyfikowanym genetycznie próbkami (soi i kukurydzy).

Przedstawione metody pozwalają tylko na uzyskanie wyniku jakościowego wskazując na obecność/nieobecność poszukiwanych sekwencji w próbce.

Wyposażenie

- mikropipety
- termocykler
- mała wirówka
- vortex
- statyw na próbki reakcyjne
- próbki reakcyjne PCR 0.2 ml
- próbki wirówkowe 1.5 ml
- oddzielne pomieszczenie z komorą UV

Wskazówki

Cały sprzęt powinien być bez zanieczyszczeń DNA i jeśli to możliwe, wysterylizowany przed użyciem.

W celu uniknięcia kontaminacji należy używać końcówek do pipet z filtrem, które chronią przed możliwymi zanieczyszczeniami w wypadku tworzenia się aerozoli.

Odczynniki

- | | |
|--------|----------------|
| • dATP | CAS1923-31-7 |
| • dCTP | CAS102783-51-7 |
| • dGTP | CAS93919-41-6 |
| • dTTP | CAS18423-43-3 |

- 10x PCR bufor (zwykle pochodzący od tego samego dostawcy, co polimeraza *Taq* DNA)
- 25 mM MgCl₂
- polimeraza *Taq* DNA
- oligonukleotydy
- olej mineralny (potrzebny w wypadku stosowania termocyklera bez pokrywy wyposażonej w funkcję grzania)
- woda wolna od nukleaz

Roztwór podstawowy 4 mM dNTP

- dNTPs mogą być dostarczane we wcześniej wymieszanych roztworach podstawowych - zawierających dATP, dCTP, dGTP, dTTP w takich samych koncentracjach – lub oddzielnie w roztworach skoncentrowanych. Jeśli używamy oddzielnych roztworów, należy każdy dNTP rozcieńczyć w sterylnej, dejonizowanej wodzie do stężenia końcowego wynoszącego 4mM dNTP w roztworze podstawowym.
- Roztwór należy podzielić na mniejsze części i przechowywać w temp. -20°C. dNTPs pozostaną stabilne przez kilka miesięcy.

Roztwór starterów 20 μM

Startery – oligonukleotydy są zwykle dostarczane w formie liofilizowanej i powinny być rozpuszczone aż do uzyskania roztworu 20 μM.

- Przygotować 20 μM roztwór starterów według wskazówek dostawcy.
 - 1 μM = 1 pmol/μl więc 20 μM = 20 pmol/μl
 - Xnmol startera + 10X μl sterylnej wody = 100 pmol/μl = 100 μM
 - Inkubować przez 5 min w 65°C, wstrząsnąć i inkubować przez następne 3 min w 65°C
 - Rozcieńczyć 1:5. Przygotować 1 mikroprobówkę wirówkową zawierającą 400 μl sterylnej wody i dodać 100 μl roztworu starterów (100 μM). Stężenie końcowe: 20 μM
- Podzielić na małe części i przechowywać w -20°C. Tak podzielone części, przechowywane w -20°C pozostają stabilne przez 6 miesięcy; startery w formie liofilizowanej pozostają stabilne w -20°C przez okres do trzech lat.

bufor 10x PCR

- Zwykle bufor 10x PCR, zawierający 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 w 25°C) i 1% Triton X-100 jest dostarczany razem z polimerazą *Taq* DNA w formie gotowej do użycia. Bufor powinien być wymieszany i zwirowany przed każdym użyciem.
- Podzielone części są przechowywane w -20°C i pozostają stabilne przez wiele miesięcy.

Roztwór 25 mM MgCl₂

Roztwór MgCl₂ “o czystości odpowiedniej do PCR” jest zwykle dostarczany razem z polimerazą *Taq* DNA w formie gotowej do użycia. Roztwór powinien być wymieszany (przy użyciu vortexu) i krótko zwirowany przed każdym użyciem (powoduje rozbicie gradientu koncentracji, który może wystąpić przy przedłużonym przechowywaniu). Przechowywać w -20°C.

Woda wolna od nukleaz

Dla Mastermixu i rozcieńczeń DNA należy przygotować w małych porcjach sterylną, nie zawierającą nukleaz, dejonizowaną wodę. Dla każdej serii analiz powinna być używana nowa porcja wody.

PCR specyficzny dla roślinnego DNA: soja- *lektyna*

Identyfikacja DNA soi jest przeprowadzana poprzez znalezienie genu lektyny. Reakcja PCR z zastosowaniem starterów GMO3/GMO4 stwierdza, czy w próbce znajduje się możliwe do powielenia DNA soi.

Charakterystyka starterów GMO3 i GMO4

GMO3	
Sekwencja	GCCCTCTACTCCACCCCATCC
Długość	22
Masa molowa (g/mol)	6471.6
Punkt topnienia * (G/C)	65.1

GMO4	
Sekwencja	GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG
Długość	23
Masa molowa (g/mol)	6981.1
Punkt topnienia * (G/C)	59.6

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrole

W każdej analizie bardzo ważne jest przeprowadzanie eksperymentów kontrolnych. Kontrole negatywne są zaprojektowane w celu sprawdzenia czy odczynniki użyte do reakcji PCR nie są zanieczyszczone przez DNA. Kontrole pozytywne zawierające scharakteryzowane próbki są również konieczne w celu sprawdzenia efektywności i specyficzności reakcji PCR.

Do analizy przeprowadzanej przy użyciu PCR muszą być dołączone następujące kontrole:

Kontrola pozytywna: czyste DNA, wyizolowane z konwencjonalnej soi

Kontrola negatywna: czyste DNA, wyizolowane z innego gatunku, nie zawierającego genu lektyny

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i kontrole bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 1.

Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 µl (48 µl z GMO3/GMO4 Mastermixu i 2 µl roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 1. GMO3/GMO4 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 µl	327.5 µl
Bufor 10x PCR	1x	5 µl	50 µl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonukleotydy GMO3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonukleotydy GMO4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Polimeraza <i>Taq</i> DNA	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
RAZEM		48 µl	480 µl

- Przygotować mikroprobówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.1
- Delikatnie wymieszać Mastermix GMO3/GMO4 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 µl Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 µl roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

PCR program* (GMO3/GMO4)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	30 sek
Przyłączanie	63°C	30 sek
Wydłużanie	72°C	30 sek
Liczba cykli	40	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

* **Uwaga:** W czasie kursu, będą używane aparaty *Perkin Elmer Gene Amp PCR system 9600, ABI 9700*. Stosowanie innych modeli termocyklerów czy termocyklerów innych producentów pozwoli na uzyskanie takich samych wyników, jeśli tylko programy będą zaadaptowane i przetestowane¹.

Analiza produktu reakcji PCR

Po amplifikacji poszukiwanej sekwencji, produkty reakcji PCR są analizowane przy użyciu elektroforezy na żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. 8 µl z reakcji PCR jest mieszane z 2 µl buforu do nakładania na żel. Następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (1.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1 godzinę i przebiega przy 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości amplikonu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 µl z 100 pz drabinki). Po rozdziale DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Para starterów GMO3/GMO4 stosowana do wykrycia natywnego dla soi genu lektyny jest używana w tym przypadku jako system kontrolny. Specyficzny dla lektyny prążek o wielkości 118 pz potwierdza, że wyizolowane DNA jest odpowiedniej jakości do amplifikacji.

W kontroli pozytywnej powielany będzie fragment o wielkości 118 pz. Kontrola negatywna i kontrola bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków.

Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nieważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki, a próbka nie daje prążka o wielkości 118 pz, oznacza to, że próbka ta nie zawiera DNA soi, które można powielić. Należy pamiętać, że inne protokoły w tej sesji są metodami jakościowymi pozwalającymi tylko na otrzymanie wyniku jakościowego (zawiera/nie zawiera).

¹ JRC i WHO nie rekomendują żadnych instrumentów wykorzystywanych podczas kursu czy wymienionych w tym przewodniku. Analizy przeprowadzone w tych laboratoriach powinny być powtarzalnie przeprowadzane przy użyciu alternatywnego sprzętu.

PCR specyficzny dla roślinnego DNA: kukurydza-zeina

Identyfikacja DNA kukurydzy jest przeprowadzana poprzez znalezienie genu zeiny. Reakcja PCR z zastosowaniem starterów ZEIN3/ZEIN4 stwierdza czy w próbce znajduje się możliwe do powielenia DNA kukurydzy.

Charakterystyka starterów ZEIN3 i ZEIN4

ZEIN3	
Sekwencja	AGTGCGACCCATATTCCAG
Długość	19
Masa molowa (g/mol)	5772.3
Punkt topnienia * (G/C)	55.2

ZEIN4	
Sekwencja	GACATTGTGGCATCATCATTT
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6410.9
Punkt topnienia * (G/C)	51.7

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrole

Kontrola pozytywna: czyste DNA, wyizolowane z konwencjonalnej kukurydzy

Kontrola negatywna: czyste DNA, wyizolowane z innego gatunku, nie zawierającego genu zeiny

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 2.

Przedstawiana procedura odnosi się do reakcji na 50 µl (48 µl z ZEIN3/ZEIN4 Mastermixu i 2 µl roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 2. ZEIN3/ZEIN4 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 µl	327.5 µl
Bufor 10x PCR	1x	5 µl	50 µl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonukleotydy ZEIN3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonukleotydy ZEIN4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Polimeraza <i>Taq</i> DNA	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
RAZEM		48 µl	480 µl

- Przygotować mikroprobówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.2
- Delikatnie wymieszać Mastermix ZEIN3/ZEIN4 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 µl Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 µl roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

PCR program (ZEIN3/ZEIN4)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	96°C	1 min
Przyłączanie	60°C	1 min
Wydłużanie	72°C	1 min
Liczba cykli	40	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Analiza produktu reakcji PCR

Po amplifikacji poszukiwanej sekwencji, produkty reakcji PCR są analizowane przy użyciu elektroforezy na żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. 8 µl z reakcji PCR jest mieszane z 2 µl buforu do nakładania na żel; następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (1.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1 godzinę i przebiega przy 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości amplikonu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 µl z 100 pz drabinki). Po rozdzieleniu DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Para starterów ZEIN3/ZEIN4 stosowana do wykrycia natywnego genu zeiny jest używana w tym przypadku jako system kontrolny w celu potwierdzenia, że wyizolowane DNA jest odpowiedniej jakości do amplifikacji. Jeśli wyizolowane DNA jest jakości odpowiedniej do amplifikacji, na żelu będzie widoczny specyficzny dla genu zeiny prążek o wielkości 227 pz. W kontroli pozytywnej powielany będzie również fragment o wielkości 227 pz.

Kontrola negatywna i bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków.

Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nieważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki, a próbka nie daje prążka o wielkości 227 pz, oznacza to, że próbka ta nie zawiera DNA soi, które można by powielić.

Metoda screeningowa pozwalająca na wykrycie Genetycznie Zmodyfikowanych Roślin

Geny znajdują się pod kontrolą promotorów i terminatorów. Najczęściej używanym promotorem w celu regulacji ekspresji transgenu jest promotor 35S (pochodzący z CaMV) i terminator nos (pochodzący z *Agrobacterium tumefaciens*). Zidentyfikowanie jednej z tych sekwencji regulatorowych w próbce zawierającej soję i/lub kukurydze wskazuje na obecność GMO.

W soi Roundup Ready® możliwa jest identyfikacja zarówno promotora 35S jak i terminatora nos, w przypadku kukurydzy tylko promotor 35S jest obecny w liniach Bt-176 i MON810.

Detekcja promotora 35S

Charakterystyka starterów p35S-cf3 i p35S-cr4

p35S-cf3	
Sekwencja	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6414.5
Punkt topnienia * (G/C)	57.4
p35S-cr4	
Sekwencja	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC
Długość	25
Masa molowa (g/mol)	7544.2
Punkt topnienia * (G/C)	56.3

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrole

Kontrola pozytywna: DNA z materiałów referencyjnych (kukurydza GM 0.5%)

Kontrola negatywna: DNA z materiałów referencyjnych (kukurydza GM 0%)

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 3.

Przedstawiana procedura odnosi się do reakcji na 50 μ l (48 μ l z p35S-cf3/p35S-cr4 Mastermixu i 2 μ l roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 3. p35S-cf3/p35S-cr4 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 μ l	327.5 μ l
Bufor 10x PCR	1x	5 μ l	50 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μ l	50 μ l
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μ l	25 μ l
20 μ M oligonukleotydy p35S-cf3	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
20 μ M oligonukleotydy p35S-cr4	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
Polimeraza Taq DNA	0.025 U/ μ l	0.25 μ l	2.5 μ l
RAZEM		48 μl	480 μl

- Przygotować mikroprobówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.3
- Delikatnie wymieszać Mastermix p35S-cf3/p35S-cr4 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 μ l Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 μ l roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

PCR program (p35S-cf3/p35S-cr4)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	25 sek
Przyłączanie	62°C	30 sek
Wydłużanie	72°C	45 sek
Liczba cykli	50	
Wydłużanie końcowe	72°C	7 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Analiza produktów PCR

Po amplifikacji produkty PCR są analizowane na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy użyciu elektroforezy. 8 µl z reakcji PCR jest mieszane z 2 µl buforu do nakładania na żel; następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (2.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1 godzinę i przebiega przy 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości amplikonu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 µl z 100 pz drabinki). Po rozdzieleniu DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Para starterów p35S-cf3/p35S-cr4 jest używana do wykrywania promotora 35S CaMV i amplifikuje fragment o wielkości 123 pz. Ten promotor reguluje ekspresję wielu roślin transgenicznych takich jak soja Roundup Ready® i kukurydza Bt-176.

W kontroli pozytywnej powielany będzie fragment o wielkości 123 pz. Kontrola negatywna i kontrola bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków. Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nieważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki, a próbka prążek o wielkości 123 pz, oznacza to, że próbka ta zawiera zmodyfikowane DNA.

Detekcja terminatora nos

Charakterystyka starterów HA-nos 118-f i HA-nos 118-r

	HA-nos 118-f
Sekwencja	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG
Długość	24
Masa molowa (g/mol)	7462.8
Punkt topnienia * (G/C)	56.2
	HA-nos 118-r
Sekwencja	GACACCGCGCGGATAATTTATCC
Długość	24
Masa molowa (g/mol)	7296.9
Punkt topnienia * (G/C)	61.2

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrole

Kontrola pozytywna: DNA z materiałów referencyjnych (RRS 0.5% GM)

Kontrola negatywna: DNA z materiałów referencyjnych (soja 0% GM)

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 4.

Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 μ l (48 μ l z HA-nos118-f/HA-nos118-r Mastermixu i 2 μ l roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 4. HA-nos118-f/HA-nos118-r Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 μ l	327.5 μ l
Bufor 10x PCR	1x	5 μ l	50 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μ l	50 μ l
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μ l	25 μ l
20 μ M oligonukleotydy HA-nos 118-f	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
20 μ M oligonukleotydy HA-nos 118-r	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
Polimeraza Taq DNA	0.025 U/ μ l	0.25 μ l	2.5 μ l
RAZEM		48 μl	480 μl

- Przygotować mikroprowówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.4
- Delikatnie wymieszać Mastermix HA-nos 118-f / HA-nos 118-r poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 μ l Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 μ l roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować

- Umieścić próbki reakcyjne PCR w termocyklerze

PCR program (HA-nos118-f/HA-nos118-r)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	25 sec
Przyłączanie	62°C	30 sec
Wydłużanie	72°C	45 sec
Liczba cykli	50	
Wydłużanie końcowe	72°C	7 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Analiza produktu PCR

Po amplifikacji produkty PCR są analizowane na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy użyciu elektroforezy. 8 µl z reakcji PCR jest mieszane z 2 µl buforu do nakładania na żel; następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (2.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1h i przebiega przy 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości amplikonu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 µl z 100 pz drabinki). Po rozdziale DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Para starterów HA-nos118-f/HA-nos118-r jest używana do wykrywania terminatora nos i amplifikuje fragment o wielkości 118 pz. Ten terminator jest obecny w soi Roundup Ready® i innych liniach roślin transgenicznym (np. kukurydzy Bt-11)

W kontroli pozytywnej powielany będzie fragment o wielkości 118 pz.

Kontrola negatywna i bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków. Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nie ważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki a próbka prążek o wielkości 118 pz oznacza to, że próbka ta zawiera zmodyfikowane DNA.

Specyficzna detekcja kukurydzy MON810, kukurydzy Bt-176 i soi Roundup Ready® przy użyciu nested PCR

Detekcja kukurydzy MON810

Ten system detekcji jest specyficzny dla kukurydzy MON810. Poszukiwanymi elementami są promotor 35S CaMV i region hsp70 ekson1/intron1, które są odpowiednio konstytutywną sekwencją regulatorową i sekwencją genu białka szoku cieplnego stosowaną dla uzyskania zwiększonego poziomu transkrypcji.

Charakterystyka starterów mg1, mg2, mg3 i mg4

mg1	
Sekwencja	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC
Długość	25
Masa molowa (g/mol)	7665.1
Punkt topnienia * (G/C)	59.6
mg2	
Sekwencja	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT
Długość	25
Masa molowa (g/mol)	7560.2
Punkt topnienia * (G/C)	57.9
mg3	
Sekwencja	ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC
Długość	25
Masa molowa (g/mol)	7472.2
Punkt topnienia * (G/C)	61.2
mg4	
Sekwencja	GCATTCAGAGAAACGTGGCAGTAAC
Długość	25
Masa molowa (g/mol)	7722.9
Punkt topnienia * (G/C)	59.6

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrole

Kontrola pozytywna: DNA z materiałów referencyjnych (MON810 0.1% GM)

Kontrola negatywna: DNA z materiałów referencyjnych (kukurydza 0% GM)

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 5.

Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 μ l (48 μ l z mg1/mg2 Mastermixu i 2 μ l roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przechowywane na lodzie.

Tabela 5. mg1/mg2 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 μ l	327.5 μ l
Bufor 10x PCR	1x	5 μ l	50 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μ l	50 μ l
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μ l	25 μ l
20 μ M oligonukleotydy mg1	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
20 μ M oligonukleotydy mg2	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
Polimeraza Taq DNA	0.025 U/ μ l	0.25 μ l	2.5 μ l
RAZEM		48 μl	480 μl

- Przygotować mikroprobówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.5
- Delikatnie wymieszać Mastermix mg1/mg2 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 μ l Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 μ l roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

PCR program (mg1/mg2)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	45 sec
Przyłączanie	60°C	50 sec
Wydłużanie	72°C	50 sec
Liczba cykli	35	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Przygotowanie Mastermixu 2

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 6. Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 µl (49 µl z mg3/mg4 Mastermixu i 1 µl zamplifikowanego roztworu DNA z pierwszej reakcji PCR). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 6. mg3/mg4 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		33.75 µl	337.5 µl
Bufor 10x PCR	1x	5 µl	50 µl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonukleotydy mg3	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonukleotydy mg4	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Polimeraza Taq DNA	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
RAZEM		49 µl	490 µl

- Przygotować mikropróbówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.6
- Delikatnie wymieszać Mastermix mg3/mg4 poprzez pipetowanie i krótko zwirować

- Przenieść po 49 μ l Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 1 μ l roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

Program dla nested PCR (mg3-mg4)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	45 sek
Przyłączanie	60°C	50 sek
Wydłużanie	72°C	50 sek
Liczba cykli	40	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Analiza produktów PCR

Po amplifikacji produkty PCR są analizowane na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy użyciu elektroforezy. 8 μ l z reakcji PCR jest mieszane z 2 μ l buforu do nakładania na żel; następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (2.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1 godzinę i przebiega przy 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości ampikonu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 μ l z 100 pz drabinki). Po rozdziale DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Pary starterów mg1/mg2 i mg3/mg4 są używane do specyficznego wykrywania kukurydzy MON810. W wyniku nested PCR amplifikowany jest fragment o wielkości 149 pz. Specyficzność jest warunkowana faktem, że startery są zaprojektowane w rejonie pokrywającym promotor E-35S oraz odcinek ekson/intron genu hsp70.

W kontroli pozytywnej powielany będzie fragment o wielkości 149 pz.

Kontrola negatywna i bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków.

Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nie ważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki, a próbka prążek o wielkości 149 pz, oznacza to, że próbka ta zawiera DNA kukurydzy MON810.

Detekcja kukurydzy Bt-176

Celem reakcji PCR jest wykrycie genu *cryIA(b)*, który chroni roślinę przed żerowaniem owadów, takich jak omacnica prosowianka.

Charakterystyka starterów CRYIA1, CRYIA2, CRYIA3 and CRYIA4

CRYIA1	
Sekwencja	CGGCCCCGAGTTCACCTT
Długość	18
Masa molowa (g/mol)	5394.6
Punkt topnienia * (G/C)	59.5
CRYIA2	
Sekwencja	CTGCTGGGGATGATGTTGTTG
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6519.2
Punkt topnienia * (G/C)	57.6
CRYIA3	
Sekwencja	CCGCACCCTGAGCAGCAC
Długość	18
Masa molowa (g/mol)	5397.6
Punkt topnienia * (G/C)	61.7
CRYIA4	
Sekwencja	GGTGGCACGTTGTTGTTCTGA
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6479.2
Punkt topnienia * (G/C)	57.6

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrole

Kontrola pozytywna: DNA z materiałów referencyjnych (Bt-176 0.1% GM)

Kontrola negatywna: DNA z materiałów referencyjnych (kukurydza 0% GM)

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu 1

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 5.

Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 μ l (48 μ l z CRYIA1/CRYIA2 Mastermixu i 2 μ l roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 7. CRYIA1/CRYIA2 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 μ l	327.5 μ l
Bufor 10x PCR	1x	5 μ l	50 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μ l	50 μ l
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μ l	25 μ l
20 μ M oligonukleotydy CRYIA1	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
20 μ M oligonukleotydy CRYIA2	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
Polimeraza <i>Taq</i> DNA	0.025 U/ μ l	0.25 μ l	2.5 μ l
RAZEM		48 μl	480 μl

- Przygotować mikropróbówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.7
- Delikatnie wymieszać Mastermix CRYIA1/CRYIA2 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 μ l Mastermixu do próbek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 μ l roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić próbki reakcyjne PCR w termocyklerze

Program PCR (CRYIA1/CRYIA2)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	40 sek
Przyłączanie	60°C	40 sek
Wydłużanie	72°C	40 sek
Liczba cykli	25	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Przygotowanie Mastermixu 2

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 8. Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 μ l (49 μ l z CRYIA3/CRYIA4 Mastermixu i 1 μ l zamplifikowanego roztworu DNA z pierwszej reakcji PCR). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 8. CRYIA3/CRYIA4 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		33.75 μ l	337.5 μ l
Bufor 10x PCR	1x	5 μ l	50 μ l
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 μ l	50 μ l
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μ l	25 μ l
20 μ M oligonukleotydy CRYIA3	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
20 μ M oligonukleotydy CRYIA4	0.5 μ M	1.25 μ l	12.5 μ l
Polimeraza Taq DNA	0.025 U/ μ l	0.25 μ l	2.5 μ l
RAZEM		49 μl	490 μl

- Przygotować mikropróbówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.8
- Delikatnie wymieszać Mastermix CRYIA3/CRYIA4 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 49 μ l Mastermixu do próbek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 1 μ l roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić próbki reakcyjne PCR w termocyklerze

Program dla nested PCR (CRYIA3/CRYIA4)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	40 sek
Przyłączanie	60°C	40 sek
Wydłużanie	72°C	40 sek
Liczba cykli	35	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Analiza produktu PCR

Po amplifikacji produkty PCR są analizowane na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy użyciu elektroforezy. 8 µl z reakcji PCR jest mieszane z 2 µl buforu do nakładania na żel; następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (2.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1 godzinę i przebiega 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości ampliconu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 µl z 100 pz drabinki). Po rozdziale DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Pary starterów CRYIA1/CRYIA2 i CRYIA3/CRYIA4 są używane do specyficznego wykrywania syntetycznego genu cryIA(b) metodą nested PCR. W wyniku nested PCR amplifikowany jest fragment o wielkości 189 pz. Gen ten jest obecny w kukurydzy Bt-176 i w innych liniach kukurydzy (np. Bt-11).

W kontroli pozytywnej powielany będzie fragment o wielkości 189 pz.

Kontrola negatywna i bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków.

Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nieważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki, a próbka prążek o wielkości 189 pz, oznacza to, że próbka ta zawiera DNA kukurydzy Bt-176.

Detekcja soi Roundup Ready®

Celem reakcji PCR jest wykrycie genu CP4 EPSPS, który zapewnia odporność na herbicyd Roundup®.

Charakterystyka starterów GMO5, GMO9, GMO7 i GMO8

GMO5	
Sekwencja	CCACTGACGTAAGGGATGACG
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6479.4
Punkt topnienia * (G/C)	59.5
GMO9	
Sekwencja	CATGAAGGACCGGTGGGAGAT
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6559.4
Punkt topnienia * (G/C)	59.5
GMO7	
Sekwencja	ATCCCACTATCCTTCGCAAGA
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6309.6
Punkt topnienia * (G/C)	55.8
GMO8	
Sekwencja	TGGGGTTTATGGAAATTGGAA
Długość	21
Masa molowa (g/mol)	6579.8
Punkt topnienia * (G/C)	51.7

*bazując na [Na⁺] z 50 mM

Kontrola

Kontrola pozytywna: DNA z materiałów referencyjnych (RRS soja 0.1%)

Kontrola negatywna: DNA z materiałów referencyjnych (soja 0% GM)

Kontrola bez matrycy: kontrola negatywna Mastermixu, w której zamiast DNA użyta jest woda

Przygotowanie Mastermixu 1

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek (włączając kontrole pozytywne/negatywne i bez matrycy) są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 9.

Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 μl (48 μl z GMO5/GMO9 Mastermixu i 2 μl roztworu DNA). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przetrzymywane na lodzie.

Tabela 9. GMO5/GMO9 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		32.75 μl	327.5 μl
Bufor 10x PCR	1x	5 μl	50 μl
25 mM MgCl_2	2.5 mM	5 μl	50 μl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 μl	25 μl
20 μM oligonukleotydy GMO5	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
20 μM oligonukleotydy GMO9	0.5 μM	1.25 μl	12.5 μl
Polimeraza <i>Taq</i> DNA	0.025 U/ μl	0.25 μl	2.5 μl
RAZEM		48 μl	480 μl

- Przygotować mikroprobówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.9
- Delikatnie wymieszać Mastermix GMO5/GMO9 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 48 μl Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 2 μl roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

PCR program (GMO5/GMO9)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	30 sek
Przyłączanie	60°C	30 sek
Wydłużanie	72°C	40 sek
Liczba cykli	25	
Wydłużanie końcowe		
Wstępna denaturacja	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Przygotowanie Mastermixu 2

Odczynniki potrzebne do serii 10 próbek są ze sobą mieszane według instrukcji podanej w Tab. 10. Przedstawiona procedura odnosi się do reakcji na 50 µl (49 µl z GMO7/GMO8 Mastermixu i 1 µl zamplifikowanego roztworu DNA z pierwszej reakcji PCR). Wszystkie odczynniki podczas przygotowywania Mastermixu są przechowywane na lodzie.

Tabela 10. GMO7/GMO8 Mastermix

	Stężenie końcowe	Mastermix na jedną reakcję	Mastermix na 10 reakcji
Sterylna, dejonizowana woda		33.75 µl	337.5 µl
Bufor 10x PCR	1x	5 µl	50 µl
25 mM MgCl ₂	2.5 mM	5 µl	50 µl
4 mM dNTPs	0.2 mM	2.5 µl	25 µl
20 µM oligonukleotydy GMO7	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
20 µM oligonukleotydy GMO8	0.5 µM	1.25 µl	12.5 µl
Polimeraza Taq DNA	0.025 U/µl	0.25 µl	2.5 µl
RAZEM		49 µl	490 µl

- Przygotować mikroprobówkę wirówkową o poj. 1.5 ml
- Dodać odczynniki według kolejności podanej w Tab.10

- Delikatnie wymieszać Mastermix GMO7/GMO8 poprzez pipetowanie i krótko zwirować
- Przenieść po 49 µl Mastermixu do probówek reakcyjnych PCR o poj. 0.2 ml
- Dodać po 1 µl roztworu DNA
- Delikatnie wstrząsnąć i krótko zwirować
- Umieścić probówki reakcyjne PCR w termocyklerze

Program dla nested PCR (GMO7/GMO8)

	Temperatura	Czas
Wstępna denaturacja	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	30 sek
Przyłączanie	60°C	30 sek
Wydłużanie	72°C	40 sek
Liczba cykli	35	
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
	4°C	∞

Po amplifikacji, próbki są krótko zwirowywane i wstawione na lód.

Analiza produktu PCR

Po amplifikacji produkty PCR są analizowane na żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy użyciu elektroforezy. 8 µl z reakcji PCR jest mieszane z 2 µl buforu do nakładania na żel; następnie próbki są nakładane na żel agarozowy (2.5%). Rozdział elektroforetyczny trwa 1 godzinę i przebiega przy 100 V. Równolegle, w celu dokładnego określenia wielkości amplikonu, rozdzielany jest marker mas molekularnych (15 µl z 100 pz drabinki). Po rozdzieleniu DNA na żelu, prążki są obserwowane przy użyciu transiluminatora. Żel może być sfotografowany w celu otrzymania wyniku eksperymentu w formie obrazu.

Interpretacja wyników

Pary starterów GMO5/GMO9 i GMO7/GMO8 są używane do specyficznego wykrywania konstruktów Roundup Ready® w soi metodą nested PCR. W wyniku nested PCR amplifikowany jest fragment o wielkości 169 pz. Startery GMO5 i GMO7 są komplementarne do promotora 35S z wirusa mozaiki kalafiora CaMV, GMO9 hybryduje z genem CP4 EPSPS z *Agrobacterium* sp. szczep CP4 a GMO8 z genem CTP EPSPS.

W kontroli pozytywnej powielany będzie fragment o wielkości 169 pz.

Kontrola negatywna i bez matrycy nie powinny dawać żadnych widocznych prążków.

Jeśli pozytywne/negatywne kontrole nie dają oczekiwanych wyników, cała analiza PCR wszystkich próbek jest nieważna.

Jeśli kontrole dają oczekiwane wyniki, a próbka prążek o wielkości 169 pz, oznacza to, że próbka ta zawiera DNA soi Roundup Ready®.