BỘ TÀI NGUYÊN VÀ MÔI TRƯỜNG

BỘ TÀI NGUYÊN VÀ MÔI TRƯỜNG	**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM** **Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**
Số: 13/2013/TT-BTNMT	*Hà Nội, ngày 21 tháng 6 năm 2013*

THÔNG TƯ
Quy định quy trình kỹ thuật và định mức kinh tế - kỹ thuật trong phát hiện sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng axít deoxyribonucleic

Căn cứ Luật Đa dạng sinh học số 20/2008/QH12 ngày 13 tháng 01 năm 2008 của Quốc hội nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam;

Căn cứ Nghị định số 69/2010/NĐ-CP ngày 21 tháng 6 năm 2010 về an toàn sinh học đối với sinh vật biến đổi gen, mẫu vật di truyền và sản phẩm của sinh vật biến đổi gen;

Căn cứ Nghị định số 21/2013/NĐ-CP ngày 04 tháng 3 năm 2013 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Tài nguyên và Môi trường;

Theo đề nghị của Tổng Cục trưởng Tổng cục Môi trường, Vụ trưởng Vụ Kế hoạch và Vụ trưởng Vụ Pháp chế,

Bộ trưởng Bộ Tài nguyên và Môi trường ban hành Thông tư quy định quy trình kỹ thuật và Định mức kinh tế - kỹ thuật trong phát hiện sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng axít deoxyribonucleic.

QUY ĐỊNH:

Điều 1. Ban hành kèm theo Thông tư này quy trình kỹ thuật và Định mức kinh tế - kỹ thuật trong phát hiện sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng axít deoxyribonucleic.

Điều 2. Thông tư này có hiệu lực thi hành kể từ ngày 05 tháng 8 năm 2013.

Điều 3. Bộ trưởng, Thủ trưởng cơ quan ngang Bộ, cơ quan thuộc Chính phủ, Chủ tịch Ủy ban nhân dân các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương, Tổng Cục trưởng Tổng cục Môi trường, Thủ trưởng các đơn vị trực thuộc Bộ Tài nguyên và Môi trường, Giám đốc Sở Tài nguyên và Môi trường các tỉnh, thành phố trực thuộc Trung ương và tổ chức, cá nhân có liên quan chịu trách nhiệm thi hành Thông tư này./.

KT. BỘ TRƯỞNG
THỨ TRƯỞNG

Bùi Cách Tuyến

QUY TRÌNH KỸ THUẬT VÀ ĐỊNH MỨC KINH TẾ - KỸ THUẬT TRONG PHÁT HIỆN SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG AXÍT DEOXYRIBONUCLEIC

(Ban hành kèm theo Thông tư số 13/2013/TT-BTNMT ngày 21 tháng 6 năm 2013 của Bộ trưởng Bộ Tài nguyên và Môi trường)

Phần 1
QUY TRÌNH PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG AXÍT DEOXYRIBONUCLEIC (ADN)

Quá trình phân tích định tính, định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bao gồm 04 bước (chi tiết xem tại Phụ lục kèm theo Thông tư này):

Bước 1: Tách chiết ADN;

Bước 2: Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN;

Bước 3: Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp PCR;

Bước 4: Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp real-time PCR (phản ứng PCR tức thời).

1. Tách chiết ADN

Theo TCVN 7606: 2007 (ISO 21571), nguyên tắc cơ bản của việc tách chiết ADN bao gồm việc giải phóng ADN ra dung dịch hỗn hợp các chất và tiếp theo là tinh sạch ADN ra khỏi hỗn hợp đó. Các bước chính để tách chiết ADN bao gồm:

- Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất;
- Nghiền mẫu;
- Tách chiết ADN;
- Tinh sạch ADN.

Có rất nhiều phương pháp để tách chiết ADN và tùy thuộc vào nguồn gốc các loại mẫu phẩm (động vật, thực vật hay vi sinh vật) có những phương pháp tách chiết phù hợp. Trong tập định mức kinh tế - kỹ thuật này áp dụng 3 phương pháp tách ADN đối với các đối tượng động vật, thực vật và vi sinh vật, cụ thể như sau:

- Tách chiết ADN của các mẫu sinh học có nguồn gốc từ thực vật dựa trên CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide);
- Tách chiết ADN của các mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật dựa trên phenol/cloroform;

- Phương pháp chiết ADN đối với nấm men và/hoặc nấm sợi thu được từ thực phẩm dựa trên phenol/cloroform.

2. Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN

Chất lượng, số lượng và tính nguyên vẹn của mẫu ADN ảnh hưởng rất lớn đến kết quả của phương pháp phân tích. Theo TCVN 7606: 2007 (ISO 21571), các bước chính của bước đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN bao gồm:

- Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất;
- Điện di ADN trên gel agarose;
- Xác định hàm lượng ADN trên máy quang phổ;
- Phân tích xử lý kết quả.

Có 2 phương pháp thông dụng để xác định nồng độ ADN trong dung dịch: Phương pháp điện di và phương pháp đo hàm lượng ADN bằng quang phổ.

3. Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen (định tính) thông qua phản ứng chuỗi trùng hợp (kỹ thuật PCR)

Phương pháp PCR thông thường được sử dụng để nhân bản một đoạn gen sử dụng cặp mồi được thiết kế đặc hiệu cho trình tự gen này. Trong trường hợp này PCR được sử dụng để phát hiện và nhận dạng sinh vật biến đổi gen hay PCR định tính.

Theo TCVN 7605: 2007 (ISO 21569), các bước chính để phát hiện và nhận dạng sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật PCR bao gồm:

- Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất;
- Thiết kế các cặp mồi nhân đoạn gen;
- Tiến hành phản ứng PCR;
- Phân tích và xử lý kết quả bằng điện di trên gel agarose.

4. Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật real-time PCR (phản ứng PCR tức thời)

Theo tiêu chuẩn quốc tế ISO 21570, các bước chính trong định lượng sản phẩm biến đổi gen bằng kỹ thuật real-time PCR bao gồm:

- Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất;
- Xây dựng các đường chuẩn ADN cho gen chuẩn (gen nội sinh) và gen đích;
- Tiến hành phản ứng real-time PCR;
- Phân tích và xử lý kết quả.

Phần 2
ĐỊNH MỨC KINH TẾ - KỸ THUẬT

Chương I
QUY ĐỊNH CHUNG

1. Phạm vi điều chỉnh: Định mức kinh tế - kỹ thuật này được áp dụng để lập, giao kế hoạch và tính đơn giá sản phẩm phục vụ lập dự toán, thanh quyết toán các công trình, dự án, nhiệm vụ liên quan đến việc xác định sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng axít deoxyribonucleic.

2. Đối tượng áp dụng: Định mức này áp dụng cho các cơ quan, tổ chức, cá nhân có hoạt động liên quan đến xác định sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng axít deoxyribonucleic.

3. Căn cứ xây dựng định mức

Định mức được xây dựng căn cứ theo:

- Nghị định số 204/2004/NĐ-CP ngày 14 tháng 12 năm 2004 của Chính phủ về chế độ tiền lương đối với cán bộ công chức, viên chức và lực lượng vũ trang;

- Thông tư số 06/2005/TT-BLĐTBXH ngày 05 tháng 01 năm 2005 của Bộ Lao động - Thương binh và Xã hội hướng dẫn phương pháp xây dựng định mức lao động trong các công ty nhà nước theo Nghị định số 206/2004/NĐ-CP ngày 14 tháng 12 năm 2004 của Chính phủ;

- Quyết định số 32/2008/QĐ-BTC ngày 29 tháng 5 năm 2008 của Bộ trưởng Bộ Tài chính về việc ban hành chế độ quản lý, tính hao mòn tài sản cố định trong cơ quan nhà nước, đơn vị sự nghiệp công lập và các tổ chức có sử dụng ngân sách nhà nước.

4. Định mức thành phần

Định mức kinh tế - kỹ thuật trong phát hiện sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng ADN bao gồm các định mức thành phần sau:

4.1. Định mức lao động công nghệ

Định mức lao động công nghệ (sau đây gọi là định mức lao động) là thời gian lao động cần thiết để sản xuất ra một sản phẩm.

Nội dung của định mức lao động công nghệ bao gồm:

a) Nội dung công việc: bao gồm các thao tác cơ bản thực hiện các bước công việc cho hoạt động phát hiện sinh vật biến đổi gen bằng phương pháp phân tích định tính, định lượng ADN;

b) Định biên: số lượng và cấp bậc kỹ thuật từng bước công việc;

c) Định mức: thời gian lao động để sản xuất ra sản phẩm. Đơn vị tính là công nhóm/đơn vị sản phẩm; ngày công tính bằng 8 giờ làm việc.

4.2. Định mức vật tư và thiết bị

Định mức vật tư và thiết bị gồm định mức dụng cụ, định mức thiết bị và định mức vật liệu:

a) Định mức dụng cụ: là thời gian sử dụng dụng cụ cần thiết để sản xuất ra sản phẩm.

Thời hạn của dụng cụ: xác định bằng phương pháp thống kê, kinh nghiệm; đơn vị là tháng.

Mức sử dụng các dụng cụ nhỏ, phụ được tính bằng 5% mức sử dụng các dụng cụ chính đã được tính định mức.

b) Định mức thiết bị: là thời gian sử dụng thiết bị cần thiết để sản xuất ra sản phẩm.

Thời hạn (niên hạn tính khấu hao) của thiết bị theo quy định của Bộ Tài chính.

c) Định mức vật liệu: là số lượng vật liệu cần thiết để sản xuất ra sản phẩm.

Mức vật liệu phụ, vụn vặt và hao hụt được tính bằng 8% mức vật liệu chính đã được tính định mức.

5. Định mức này không quy định các công việc khảo sát, thu thập mẫu

6. Quy định chữ viết tắt

TT	Chữ viết tắt	Nội dung viết tắt
1	Định mức KT-KT	Định mức kinh tế - kỹ thuật
2	BHLĐ	Bảo hộ lao động
3	TCVN	Tiêu chuẩn Quốc gia
4	ĐVT	Đơn vị tính
5	KS1	Kỹ sư bậc 1
6	KS4	Kỹ sư bậc 4
7	ADN	Axít deoxyribonucleic
8	RNA	Axít ribonucleic
9	CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
10	PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp (Polymerase chain reaction)
11	Real-time PCR	Phản ứng PCR tức thời

7. Áp dụng định mức: Trong quá trình áp dụng Định mức kinh tế - kỹ thuật này, nếu có vướng mắc hoặc phát hiện bất hợp lý, đề nghị phản ánh về Bộ Tài nguyên và Môi trường để tổng hợp, điều chỉnh kịp thời.

Chương II
ĐỊNH MỨC KINH TẾ - KỸ THUẬT TRONG PHÁT HIỆN SINH VẬT BIẾN ĐỔI GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG AXÍT DEOXYRIBONUCLEIC (ADN)

1. Định mức lao động

1.1. Nội dung công việc

Phương pháp phân tích này dựa vào các tính chất cụ thể của trình tự ADN đích để xác định sự có mặt và định lượng ADN có nguồn gốc từ sinh vật biến đổi gen.

1.2. Định biên: nhóm 2 lao động gồm 1 KS1 và 1 KS4

1.3. Định mức: công nhóm/mẫu

Bảng số 01

TT	Công việc	Mức
1	Tách chiết ADN	0,50
2	Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN	0,25
3	Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật PCR	0,60
4	Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật real-time PCR	0,60

2. Định mức vật tư và thiết bị

2.1. Định mức dụng cụ: Ca/mẫu

2.1.1. Tách chiết ADN

a) Tách chiết ADN của các mẫu sinh học có nguồn gốc từ thực vật dựa trên CTAB

Bảng số 02

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
1	Áo BHLĐ	cái	9	0,80
2	Giá để dụng cụ, hóa chất	cái	60	0,20
3	Đồng hồ treo tường	cái	48	0,20
4	Đồng hồ hẹn giờ	cái	24	0,07

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
5	Kính bảo hộ	cái	3	0,80
6	Ống đong (loại 50, 100, 250ml)	ống	12	0,06
7	Hộp bảo quản mẫu 81 vị trí	hộp	24	0,40
8	Khay đựng mẫu 45 vị trí	cái	24	0,40
9	Hộp đựng đầu tip 10µl tiệt trùng	hộp	24	0,40
10	Hộp đựng đầu tip 200µl tiệt trùng	hộp	24	0,40
11	Máy trộn mẫu (vortex)	cái	60	0,02
12	Phích đá giữ mẫu	cái	24	0,40
13	PIPETman loại 2µl	cái	36	0,10
14	PIPETman loại 10µl	cái	36	0,10
15	PIPETman loại 100µl	cái	36	0,10
16	PIPETman loại 1000µl	cái	36	0,10
17	Bút viết	cái	6	0,02
18	Bút viết kính	cái	6	0,02
19	Sổ hướng dẫn thí nghiệm	quyển	24	0,02
20	Chày, cối sứ	bộ	12	0,02
21	Đèn neon 40W	bộ	48	0,80
22	Máy hút ẩm 2kW	cái	36	0,05
23	Máy hút bụi 1,5kW	cái	36	0,01
24	Quạt thông gió 40W	cái	12	0,13
25	Quạt trần 100W	cái	60	0,13
26	Điện năng	kW		1,39

b) Tách chiết ADN của các mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật dựa trên phenol/cloroform

Áp dụng theo quy định tại mục a của 2.1.1. ở trên

c) Phương pháp chiết ADN đối với nấm men và/hoặc nấm sợi thu được từ thực phẩm dựa trên phenol/cloroform

Bảng số 03

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
1	Áo BHLĐ	cái	9	0,80
2	Giá để dụng cụ, hóa chất	cái	60	0,40

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
3	Đồng hồ treo tường	cái	48	0,40
4	Đồng hồ hẹn giờ	cái	24	0,03
5	Kính bảo hộ	cái	3	0,40
6	Ống đong (loại 50, 100, 250ml)	ống	12	0,06
7	Hộp bảo quản mẫu 81 vị trí	hộp	24	0,40
8	Khay đựng mẫu 45 vị trí	cái	24	0,40
9	Hộp đựng đầu tip 10µl tiệt trùng	hộp	24	0,40
10	Hộp đựng đầu tip 200µl tiệt trùng	hộp	24	0,40
11	Máy trộn mẫu (vortex)	cái	60	0,02
12	Phích đá giữ mẫu	cái	24	0,40
13	PIPETman loại 2µl	cái	36	0,10
14	PIPETman loại 10µl	cái	36	0,10
15	PIPETman loại 100µl	cái	36	0,10
16	PIPETman loại 1000µl	cái	36	0,10
17	Bút viết	cái	6	0,02
18	Bút viết kính	cái	6	0,02
19	Sổ hướng dẫn thí nghiệm	quyển	24	0,02
20	Đèn neon 40W	bộ	48	0,80
21	Máy hút ẩm 2kW	cái	36	0,05
22	Máy hút bụi 1,5kW	cái	36	0,01
23	Quạt thông gió 40W	cái	12	0,13
24	Quạt trần 100W	cái	60	0,13
25	Điện năng	kW		1,39

2.1.2. Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN của sinh vật biến đổi gen

Bảng số 04

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
1	Áo BHLĐ	cái	9	0,40
2	Bàn máy vi tính	cái	72	0,15
3	Ghế máy vi tính	cái	72	0,15
4	Chuột máy tính	cái	6	0,15
5	Ổn áp (chung) 10A	cái	48	0,04

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
6	Giá để dụng cụ, hóa chất	cái	48	0,20
7	Đồng hồ treo tường	cái	48	0,20
8	Kính bảo hộ	cái	12	0,40
9	Khay đựng mẫu 45 vị trí	cái	24	0,20
10	Hộp đựng đầu tip 10µl tiệt trùng	hộp	24	0,20
11	Hộp đựng đầu tip 200µl tiệt trùng	hộp	24	0,20
12	Máy trộn mẫu (vortex)	cái	60	0,02
13	PIPETman loại 2µl	cái	36	0,05
14	PIPETman loại 10µl	cái	36	0,05
15	PIPETman loại 100µl	cái	36	0,05
16	PIPETman loại 1000µl	cái	36	0,05
17	Bút viết	cái	6	0,02
18	Bút viết kính	cái	6	0,02
19	Sổ hướng dẫn thí nghiệm	quyển	24	0,02
20	Lò vi sóng 0,5kW	cái	36	0,02
21	Đèn neon 40W	bộ	48	0,40
22	Máy hút ẩm 2kW	cái	36	0,02
23	Máy hút bụi 1,5kW	cái	36	0,01
24	Quạt thông gió 40W	cái	12	0,06
25	Quạt trần 100W	cái	60	0,06
26	Điện năng	kW		0,75

2.1.3. Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật PCR

Bảng số 05

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
1	Áo BHLĐ	cái	9	0,96
2	Dép đi trong phòng	đôi	6	0,96
3	Bàn máy vi tính	cái	72	0,09
4	Ghế máy vi tính	cái	72	0,09
5	Chuột máy tính	cái	6	0,09
6	Ổn áp (chung) 10A	cái	48	0,02
7	Giá để dụng cụ, hóa chất	cái	60	0,24

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
8	Kính bảo hộ	cái	3	0,96
9	Hộp bảo quản mẫu 81 vị trí	hộp	24	0,48
10	Hộp đựng đầu tip 10µl	hộp	24	0,48
11	Hộp đựng đầu tip 200µl	hộp	24	0,48
12	Máy tính tay	cái	24	0,03
13	Phích đá giữ mẫu	cái	24	0,48
14	PIPETman loại 2µl	cái	36	0,20
15	PIPETman loại 10µl	cái	36	0,12
16	PIPETman loại 100µl	cái	36	0,12
17	PIPETman loại 1000µl	cái	36	0,12
18	Bút viết	cái	6	0,03
19	Bút viết kính	cái	6	0,03
20	Sổ thí nghiệm	quyển	48	0,03
21	Máy trộn mẫu (vortex) 0,1kW	cái	60	0,03
22	Đèn neon 40W	bộ	48	0,96
23	Máy hút ẩm 2kW	cái	36	0,06
24	Máy hút bụi 1,5kW	cái	36	0,01
25	Quạt thông gió 40W	cái	12	0,16
26	Quạt trần 100W	cái	60	0,16
27	Điện năng	kW		1,67

2.1.4. Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật phản ứng real-time PCR

Bảng số 06

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
1	Áo BHLĐ	cái	9	0,96
2	Dép đi trong phòng	đôi	6	0,96
3	Bàn máy vi tính	cái	72	0,18
4	Ghế máy vi tính	cái	72	0,18
5	Chuột máy tính	cái	6	0,18
6	Ổn áp (chung) 10A	cái	48	0,05
7	Đồng hồ treo tường	cái	48	0,24

TT	Danh mục dụng cụ	ĐVT	Thời hạn (tháng)	Mức (ca/mẫu)
8	Hộp bảo quản mẫu	hộp	24	0,48
9	Ống đỡ mao quản để ly tâm	hộp	36	0,10
10	Hộp đựng tip 10µl tiệt trùng	hộp	24	0,48
11	Hộp đựng tip 200µl tiệt trùng	hộp	24	0,48
12	Máy trộn mẫu (vortex) 0,1kW	cái	72	0,03
13	PIPETman loại 2µl	cái	36	0,12
14	PIPETman loại 10µl	cái	36	0,12
15	PIPETman loại 100µl	cái	36	0,12
16	PIPETman loại 1000µl	cái	36	0,12
17	Bút viết	cái	6	0,03
18	Bút viết kính	cái	6	0,03
19	Sổ thí nghiệm	quyển	48	0,03
20	Đèn neon 40W	bộ	48	0,96
21	Máy hút ẩm 2kW	cái	36	0,06
22	Máy hút bụi 1,5kW	cái	36	0,01
23	Quạt thông gió 40W	cái	12	0,16
24	Quạt trần 100W	cái	60	0,16
25	Điện năng	kW		1,67

2.2. Định mức thiết bị: Ca/mẫu

2.2.1. Tách chiết ADN

Bảng số 07

TT	Danh mục thiết bị	ĐVT	Công suất	Mức (ca/mẫu)
a	Tách chiết ADN các mẫu sinh học có nguồn gốc từ thực vật dựa trên CTAB			
1	Điều hòa nhiệt độ	cái	2,20	0,13
2	Nồi hấp dụng cụ	cái	2,00	0,02
3	Tủ hút độc	cái	1,00	0,40
4	Tủ lạnh bảo quản mẫu	cái	0,10	0,40
5	Máy ly tâm	cái	0,30	0,03
6	Cân phân tích	cái	0,01	0,03
7	Máy đo pH	cái	0,02	0,03
8	Bình chứa nitơ lỏng	cái		0,40

TT	Danh mục thiết bị	ĐVT	Công suất	Mức (ca/mẫu)
9	Máy ủ nhiệt	cái	0,10	0,40
	Điện năng	kW		6,85
b	Tách chiết ADN các mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật dựa trên phenol/cloroform			Theo quy định tại mục a trên
c	Tách chiết ADN đối với nấm men, nấm sợi thu được từ thực phẩm dựa trên phenol/cloroform			
1	Điều hòa nhiệt độ	cái	2,20	0,13
2	Nồi hấp dụng cụ	cái	2,00	0,03
3	Tủ hút độc	cái	1,00	0,40
4	Tủ lạnh bảo quản mẫu	cái	0,10	0,40
5	Máy ly tâm	cái	0,30	0,03
6	Cân phân tích	cái	0,01	0,03
7	Máy đo pH	cái	0,02	0,03
8	Bình chứa nitơ lỏng	cái		0,40
9	Máy ủ nhiệt	cái	0,10	0,40
10	Máy nghiền bi	cái	0,10	0,03
11	Điện năng	kW		7,05

2.2.2. Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN của sinh vật biến đổi gen

Bảng số 08

TT	Danh mục thiết bị	ĐVT	Công suất	Mức (ca/mẫu)
1	Máy điều hòa	cái	2,20	0,06
2	Tủ lạnh giữ mẫu	cái	0,10	0,20
3	Máy ly tâm	cái	0,30	0,01
4	Máy soi gel nối với máy tính	cái	0,03	0,01
5	Bộ điện di ngang và nguồn điện	cái	0,05	0,05
6	Máy đo pH để bàn	cái	0,05	0,01
7	Cân phân tích	cái	0,01	0,01
8	Máy đo quang phổ	cái	0,05	0,08
9	Máy vi tính	cái	0,40	0,08
10	Máy in laser A4	cái	0,40	0,01
12	Điện năng	kW		1,67

2.2.3. Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật PCR

Bảng số 09

TT	Danh mục thiết bị	ĐVT	Công suất	Mức (ca/mẫu)
1	Máy điều hòa	cái	2,20	0,16
2	Máy ly tâm	cái	0,30	0,03
3	Tủ lạnh giữ mẫu	cái	0,10	0,48
4	Cân phân tích	cái	0,01	0,03
5	Máy soi gel nối với máy tính	cái	0,03	0,12
6	Máy nhân gen (PCR)	cái	0,30	0,06
7	Bộ điện di ngang và nguồn điện	cái	0,05	0,12
8	Máy vi tính	cái	0,40	0,09
9	Máy in laser A4	cái	0,40	0,01
11	Điện năng	kW		4,06

2.2.4. Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật real-time PCR

Bảng số 10

TT	Danh mục thiết bị	ĐVT	Công suất	Mức (ca/mẫu)
1	Điều hòa nhiệt độ	cái	2,20	0,16
2	Máy real-time PCR	cái	0,45	0,18
3	Tủ lạnh bảo quản mẫu	cái	0,10	0,48
4	Máy ly tâm	cái	0,30	0,03
5	Tủ giữ mẫu đông lạnh (-20ºC)	cái	0,15	0,48
6	Máy vi tính	cái	0,40	0,18
7	Máy in laser A4	cái	0,40	0,02
8	Máy photocopy	cái	1,50	0,05
9	Điện năng	kW		6,40

2.3. Định mức vật liệu: *Tính cho 1 mẫu*

2.3.1. Tách chiết ADN

a) Tách chiết ADN các mẫu sinh học có nguồn gốc từ thực vật dựa trên CTAB

Bảng số 11

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
1	Nitơ lỏng	lít	0,50
2	CTAB (500g/lọ)	lọ	0,001

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
3	RNase (25mg)	lọ	0,02
4	Na_2EDTA (500g/lọ)	lọ	0,002
5	Tris-Cl (500g/lọ)	lọ	0,0002
6	Cloroform	lít	0,01
7	2-isopropanol	lít	0,0015
8	Nước cất khử ion vô trùng	lít	0,02
9	Proteinase K (25mg)	lọ	0,05
10	Alpha amylase (100mg)	lọ	0,005
11	Ethanol	lít	0,01
12	NaCl	kg	0,0011
13	HCl 37%	lít	0,005
14	NaOH	kg	0,001
15	Ống Falcon 50ml (25 ống/túi)	túi	0,20
16	Ống Falcon 15ml (50 ống/túi)	túi	0,04
17	Khẩu trang dùng 1 lần (50 chiếc/hộp)	hộp	0,08
18	Đầu côn loại 100, 200µl (1000 cái/túi)	túi	0,02
19	Đầu côn loại 1000µl (500 cái/túi)	túi	0,02
20	Ống eppendorf 1,5ml (1000 cái/túi)	túi	0,03
21	Ống eppendorf 2ml (1000 cái/túi)	túi	0,005
22	Hóa chất sát trùng tiêu chuẩn	lít	0,01

b) Tách chiết ADN các mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật dựa trên phenol/cloroform

Bảng số 12

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
1	Nitơ lỏng	lít	0,50
2	Natri dodecyl sulfat (SDS) 100g	lọ	0,025
3	RNase (12mg)	lọ	0,04
4	Na_2EDTA (500g/lọ)	lọ	0,004
5	Tris-Cl (500g/lọ)	lọ	0,002
6	Cloroform	lít	0,0216
7	Phenol	lít	0,025
8	Isoamyl alcohol	lít	0,001
9	Nước cất khử ion vô trùng	lít	0,02
10	Proteinase K (25mg)	lọ	0,16

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
11	Acid acetic băng	lít	0,001
12	Ethanol	lít	0,02
13	Kali acetat	kg	0,001
14	Ống Falcon 50ml (25 ống/túi)	túi	0,2
15	Ống Falcon 15ml (50 ống/túi)	túi	0,04
16	Khẩu trang dùng 1 lần (50 cái/hộp)	hộp	0,08
17	Đầu côn loại 100, 200µl (1000 cái/túi)	túi	0,02
18	Đầu côn loại 1000µl (500 cái/túi)	túi	0,04
19	Ống eppendorf 1,5ml (1000 cái/túi)	túi	0,03
20	Ống eppendorf 2ml (1000 cái/túi)	túi	0,015
21	Hóa chất sát trùng tiêu chuẩn	lít	0,01

c) Tách chiết ADN đối với nấm men và nấm sợi thu được từ thực phẩm dựa trên phenol/cloroform

Bảng số 13

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
1	RNase (25mg)	lọ	0,004
2	Na_2EDTA (500g/lọ)	lọ	0,0006
3	Tris-Cl (500g/lọ)	lọ	0,0002
4	Cloroform	lít	0,0015
5	Phenol	lít	0,0016
6	Isoamyl alcohol	lít	0,0006
7	Nước cất khử ion vô trùng	lít	0,02
8	Natri dodecyl sulfat (SDS) 100g	lọ	0,012
9	Acid acetic glacial	lít	0,001
10	Ethanol	lít	0,003
11	Kali acetat	kg	0,001
12	Ống Falcon 50ml (25 ống/túi)	túi	0,10
13	Ống Falcon 15ml (50 ống/túi)	túi	0,10
14	Khẩu trang dùng 1 lần (50 cái/hộp)	hộp	0,08
15	Đầu côn loại 100, 200µl (1000 cái/túi)	túi	0,03
16	Đầu côn loại 1000µl (500 cái/túi)	túi	0,02
17	Ống eppendorf 1,5ml (1000 cái/túi)	túi	0,01
18	Ống eppendorf 2ml (1000 cái/túi)	túi	0,01
19	Hạt thủy tinh 100g	lọ	0,01
20	Hóa chất sát trùng tiêu chuẩn	lít	0,01

2.3.2. Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN của sinh vật biến đổi gen (tính cho 1 mẫu)

Bảng số 14

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
1	Tris-Cl (1000g/lọ)	lọ	0,02
2	Na_2EDTA (500g/lọ)	lọ	0,001
3	H_3BO_3 (500g/lọ)	lọ	0,002
4	Glycerol (1000ml/lọ)	lọ	0,005
5	Bromophenol blue (5 g/lọ)	lọ	0,0005
6	Nước cất khử ion vô trùng	lít	1,00
7	Ethidium bromide (10mg/lọ)	lọ	0,05
8	Thang ADN chuẩn 1kb (100µl/ống)	ống	0,05
9	Agarose (100g/lọ)	lọ	0,005
10	Hóa chất sát trùng tiêu chuẩn	lít	0,01
11	Găng tay	hộp	0,04
12	Parafilm (0,1 x 38m)	cuộn	0,001
13	Đầu côn loại 10µl (1000 cái/túi)	túi	0,05
14	Đầu côn loại 100, 200µl (1000 cái/túi)	túi	0,02
15	Đầu côn loại 1000µl (500 cái/túi)	túi	0,05
16	Cuvett nhựa	cái	5,00
17	Ống eppendorf 1,5ml (1000 cái/túi)	túi	0,025

2.3.3. Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen: tính cho 1 mẫu - sử dụng 5 cặp mồi

Bảng số 15

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
1	Các cặp mồi (Primers)	nucleotide	0,005
2	Taq polymerase (100 units/lọ)	lọ	0,05
3	dNTPs 100 mM, 1ml/lọ	lọ	0,005
4	Ethidium bromide (10mg/lọ)	lọ	0,10
5	Tris Cl (500g/lọ)	lọ	0,08
6	EDTA (500g/lọ)	lọ	0,002
7	Glycerol (1000ml/lọ)	lọ	0,0005
8	Bromophenol blue (5g/lọ)	lọ	0,0005
9	Nước cất khử ion vô trùng	lít	1,50

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
10	Agarose (100g/lọ)	lọ	0,01
11	Thang ADN chuẩn 1 kb (100µl/ống)	ống	0,1
12	Hóa chất sát trùng tiêu chuẩn	lít	0,05
13	Găng tay (50 đôi/hộp)	hộp	0,08
14	Khẩu trang (50 cái/hộp)	hộp	0,08
15	Đầu côn loại 10µl (1000 cái/túi)	túi	0,05
16	Đầu côn loại 100µl, 200µl (1000 cái/túi)	túi	0,04
17	Ống PCR 0,5ml (1000 cái/túi)	túi	0,05
18	Ống eppendorf 1,5ml (1000 cái/túi)	túi	0,01

2.3.4. Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen: tính cho 1 mẫu

Bảng số 16

TT	Danh mục vật liệu	ĐVT	Mức
1	Các cặp mồi nucleotide	nucleotide	0,005
2	Các trình tự nucleotide đặc hiệu chuỗi được đánh dấu huỳnh quang	trình tự nucleotide	0,005
3	Nước cất khử ion vô trùng	lít	0,005
4	LightCycle® Taqman Master CAT.No 04535286001 (bao gồm: FastStart Taq ADN Polymerase, đệm phản ứng, MgCl2 và dNTP (dùng dUTP thay thế dTTP)	kít	0,17
5	LightCycle® Uracil *N*-glycosylase (tối ưu)	kít	0,02
6	Đầu côn loại 10µl (1000 cái/túi)	túi	0,02
7	Đầu côn loại 100, 200µl (1000 cái/túi)	túi	0,02
8	Ống eppendorf loại 1,5ml (500 cái/túi)	túi	0,02
9	Ống mao quản cho phản ứng real-time PCR (96 ống/hộp)	hộp	0,18
10	Hóa chất sát trùng tiêu chuẩn	lít	0,10
11	Găng tay (dùng 1 lần)	hộp	0,06
12	Giấy A4	ram	0,02
13	Mực in	hộp	0,004
14	Mực photocopy	hộp	0,008

Phụ lục

QUY TRÌNH KỸ THUẬT PHÂN TÍCH ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG AXIT DEOXYRIBONUCLEIC

(Ban hành kèm theo Thông tư số 13/2013/TT-BTNMT ngày 21 tháng 6 năm 2013 của Bộ trưởng Bộ Tài nguyên và Môi trường)

1. Tách chiết ADN

Đối với động vật, thực vật và vi sinh vật thì phương pháp tách chiết ADN được áp dụng theo các phương pháp khác nhau, như sau:

a) Phương pháp chiết ADN các mẫu sinh học có nguồn gốc từ thực vật dựa trên CTAB

Phương pháp này sử dụng để chiết ADN từ thực vật và các loại chất nền có nguồn gốc từ thực vật, do có khả năng loại bỏ các hợp chất polysacarit và polyphenol vốn có ảnh hưởng đến chất lượng ADN. Phương pháp này cũng có thể dùng cho các loại chất nền khác.

Các bước tiến hành cơ bản:

- Nghiền mẫu thử thành dạng bột mịn bằng cối chày sứ trong nitơ lỏng;

- Phân giải mẫu bằng nhiệt với sự có mặt của CTAB, tùy thuộc vào loại chất nền, cần bổ sung thêm các enzyme khác vào đệm chiết như alpha amylaza để thủy phân tinh bột, enzyme proteinaza-K để loại trừ protein và enzyme Ribonucleaza để phân giải RNA;

- Loại bỏ các tạp chất như các polysacarit và các protein bằng cloroform;

- Kết tủa các ADN bởi isopropanol và rửa bằng ethanol.

b) Phương pháp chiết ADN từ các mẫu sinh học có nguồn gốc từ động vật dựa trên phenol/cloroform

Phương pháp này có thể dùng để chiết ADN ra khỏi các loại chất nền khác nhau. Phenol thường rất thích hợp để biến tính các protein và phá hủy các enzyme nucleaza.

Các bước tiến hành cơ bản:

- Nghiền mẫu thử thành dạng bột mịn bằng cối chày sứ trong nitơ lỏng;

- Phân hủy mẫu dưới sự có mặt của natri dodecyl sulfat và hàm lượng EDTA cao; tùy thuộc vào loại chất nền cần bổ sung thêm enzyme proteinaza-K để loại trừ protein và enzyme Rnaza để phân giải RNA;

- Loại bỏ các tạp chất như các phân tử ưa mỡ, các chất polysacarit, các protein và các nuleaza bằng phenol và cloroform;

- Kết tủa ADN cuối cùng bởi isopropanol và rửa bằng ethanol loại trừ các muối và cloroform còn dư.

c) Phương pháp chiết ADN đối với các mẫu sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật dựa trên phenol/cloroform

Phương pháp này mô tả quy trình chiết và tinh sạch ADN đạt chất lượng dùng cho phản ứng PCR từ nấm men hoặc nấm sợi, hoặc các quần thể vi khuẩn được phân lập. Phương pháp này cũng thích hợp đối với việc truy nguyên ADN từ các sinh vật biến đổi gen trong các loại chất nền phức hợp cao.

Việc phân lập vi khuẩn ra khỏi chất nền, nuôi cấy vi khuẩn tăng thu sinh khối tế bào, sau đó tách chiết ADN tổng số từ vi khuẩn phân lập sẽ cho kết quả tin cậy nhất.

Các bước tiến hành cơ bản:

- Các vi khuẩn, nấm men hoặc nấm sợi bị phá vỡ và ADN được tách chiết đồng thời bằng cách nghiền trong hỗn hợp Tris-phenol-cloroform-EDTA-SDS với tốc độ cao trong sự có mặt của các hạt thuỷ tinh;

- Đối với phản ứng PCR định lượng cần ủ mẫu với Rnaza để phân giải RNA;

- Kết tủa ADN bằng ethanol.

2. Đánh giá chất lượng và xác định hàm lượng ADN

Hai phương pháp thông dụng để xác định nồng độ ADN trong dung dịch:

Phương pháp điện di

ADN được phân tách bằng phương pháp điện di trên khuôn gel agarose dựa trên điện tích và phân tử lượng của chính nó. Sau khi điện di, bản gel được nhuộm bằng dung dịch Ethidium bromide (EtBr), EtBr sẽ liên kết vào các phân tử ADN và khi được kích thích bằng ánh sáng UV sẽ phát huỳnh quang da cam. Do lượng huỳnh quang tỷ lệ với lượng ADN tổng số, nên số lượng ADN có trong mẫu có thể được ước tính bằng cách so sánh huỳnh quang được tạo ra bởi mẫu chưa biết với một dãy định lượng chuẩn.

Đo hàm lượng ADN bằng quang phổ

Các acid nucleic trong dung dịch sẽ hấp thụ ánh sáng tia cực tím (UV) trong dải từ 210nm đến 300nm với độ hấp thụ cực đại ở 260nm. Vì các ADN và RNA và các nucleotide cùng có độ hấp thụ cực đại ở 260nm, nên ADN không thể xác định bằng máy đo quang phổ trong vùng cực tím khi dung dịch bị nhiễm nucleotide và RNA. Do vậy RNA cần được loại bỏ bằng phương pháp thủy phân với enzyme RNase. Các nucleotide và oligonucleotide thu được từ thủy phân RNA cũng cần được loại bỏ, nếu không loại bỏ sẽ dẫn đến đánh giá thừa hàm lượng ADN của mẫu thử. Ngoài ra ADN xoắn kép hấp thụ ánh sáng UV ít hơn ADN xoắn đơn nên cần lưu ý đến hệ số hấp thụ khi tính toán nồng độ.

Việc chuẩn máy đo quang phổ cần được thực hiện định kỳ bằng cách đo nồng độ của các dung dịch ADN đối chứng.

3. Phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen (định tính) thông qua phản ứng chuỗi trùng hợp (kỹ thuật PCR)

Nguyên tắc chung

Phương pháp PCR dựa trên nguyên tắc bắt cặp đặc hiệu của các đoạn ADN có trình tự bổ sung và phản ứng kéo dài đoạn trình tự mồi nhờ enzym *Taq* ADN polymerase để khuếch đại theo hàm mũ các đoạn ADN đích lên hàng triệu lần. PCR được xem như là một bản dịch đơn giản hóa của quá trình sao mã ADN mà quá trình này xuất hiện trong suốt thời kỳ phân chia tế bào. PCR bao gồm 3 bước chính: biến tính đoạn ADN, gắn mồi oligonucleotide tổng hợp, kéo dài mồi bởi ADN polymerase. Chu kỳ gồm 3 bước này được lặp đi lặp lại nhiều lần, mỗi lần làm tăng gấp đôi số lượng sản phẩm ban đầu. Sự khuếch đại này được tính theo công thức $x(1+E)^n$ với x là số lượng mẫu ban đầu, E là hiệu suất của quá trình khuếch đại, n là chu kỳ của phản ứng PCR. Sau một vài chu kỳ, sản phẩm tạo thành được tính bằng kích thước giữa hai đầu cuối 5' của hai đoạn mồi.

Các phương pháp phát hiện và nhận dạng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật PCR bao gồm các phương pháp như sau:

Phương pháp đặc hiệu taxon - đích

Taxon là cấp phân loại, đơn vị phân loại. Taxon đích là đơn vị phân loại của sinh vật biến đổi gen. Đây là phương pháp thông thường để phát hiện trình tự ADN trong một taxon đích, thường là một loài nhưng có thể là cấp phân loại nhỏ hơn hoặc cao hơn. Các phương pháp dựa vào taxon đích để đánh giá sự có mặt, chất lượng và số lượng ADN có nguồn gốc từ taxon và đôi khi còn được sử dụng là đơn vị chuẩn để định lượng tương đối vật liệu có nguồn gốc biến đổi gen.

Ví dụ trình tự nucleotide của gen lectin *Le*1 đậu tương thu được từ Ngân hàng dữ liệu gen được sử dụng làm gen đơn đặc hiệu trong xác định đặc hiệu taxon đích để phát hiện thành phần từ đậu tương.

Phương pháp sàng lọc PCR để phát hiện ADN của sinh vật biến đổi gen

Phương pháp sàng lọc PCR là phương pháp phát hiện các yếu tố di truyền thông thường đối với một số sinh vật biến đổi gen (chẳng hạn như gen khởi động, gen kết thúc hoặc một số yếu tố di truyền được quan tâm khác). Phương pháp sàng lọc nhanh và đáng tin cậy một số lượng lớn các mẫu thử.

Phát hiện sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật PCR chủ yếu dựa vào các cặp mồi đặc hiệu cho vùng promoter và terminator. Hầu hết các trình tự ADN chuyển vào hệ gen thực vật dưới sự điều khiển CaMV 35S promoter, chỉ có một vài trường hợp sử dụng các promoter biểu hiện đặc hiệu ở phần chuyên hóa như rễ, thân, hạt… hay các promoter cảm ứng. Hiện nay rất nhiều các cây trồng biến đổi gen đã được cấp phép trồng mang ít nhất một bản sao của 35S promoter và T-Nos terminator

(phân lập từ gen tổng hợp nopaline ở *Agrobacterium tumefaciens*). Một gen khác được sử dụng khá phổ biến là gen chọn lọc kanamycin *npt*II phân lập từ *Escherichia coli* transposon 5. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và virus khảm súp lơ (*Cauliflower mosaic virus*) đều nằm trong các danh mục các loài gây hại cho thực vật và đặc biệt virus khảm súp lơ ngoài gây bệnh cho súp lơ còn gây bệnh cho các thành viên khác thuộc họ *Brassicceae (Cruciferae)* cũng như họ *Resedaceae* và *Solanaceae*. Vì thế, kết quả dương tính từ các mẫu *Brassicaceae, Resedceae* và *Solanaceae* cần được xử lý cẩn thận. Để phân biệt giữa nhiễm virus và vật liệu biến đổi gen cần có phương pháp phát hiện virus.

Đối với động vật biến đổi gen, thường các promoter sử dụng có nguồn gốc hoặc từ động vật như methallothionein (MT), thymidine kinase, ß-actin, amylase, insulin, ß-lactoglobulin, adiposite P2... hoặc từ virus động vật như Simian virus (SV40), Rous sarcoma virus (RSV)... Tuy nhiên do các promoter có nguồn gốc từ động vật dễ gây ra nhầm lẫn với promoter nội sinh của vật chủ, nên các promoter có nguồn gốc từ virus động vật có thể được sử dụng để sàng lọc sự có mặt của ADN có nguồn gốc động vật.

Phương pháp nhận dạng cấu trúc đặc thù (event specific) để phát hiện trình tự gen đích của các sản phẩm biến đổi gen

Phương pháp này được sử dụng nhằm phát hiện sự tổ hợp của các trình tự ADN được đưa vào hệ gen vật chủ, cấu trúc này chỉ tìm thấy trong các dòng có nguồn gốc từ sinh vật biến đổi gen. Trường hợp để phát hiện ngô T25/"LibertyLink" kháng lại thuốc diệt cỏ nhờ biến đổi gen trong các nguyên liệu thô bằng cách khuếch đại vùng nối giữa trình tự ADN có nguồn gốc từ promoter 35S-CaMV và gen pat (gen kháng thuốc trừ cỏ). Phương pháp này không phân biệt được các giống ngô mà chỉ sử dụng để phát hiện sự có mặt của đoạn gen chuyển trong hạt và cây ngô.

Kích thước của đoạn gen đích sau khi khuếch đại bằng phản ứng PCR được xác định khi kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của đoạn ADN đích dự kiến. Các sản phẩm PCR được phân tích và xử lý bằng phương pháp điện di trên gel agarose và nhuộm bởi ethidium bromide. Gel agarose 1,5% là thích hợp để phân tích các sản phẩm của PCR từ 150-1000 bp. Thang ADN chuẩn có kích thước trong khoảng 0,1-10kb để phân biệt độ lớn các đoạn nucleotide khác nhau.

4. Định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen bằng kỹ thuật real-time PCR

Real-time PCR có thể được hiểu là phản ứng PCR động (kinetic PCR) mà trong đó số liệu phân tích được thu nhận thông qua phản ứng PCR, chính vì vậy mà sự nhân bản các gen đặc hiệu và việc phát hiện các sản phẩm có thể được kết hợp trong cùng một bước tiến hành thông qua việc sử dụng các loại chất phát huỳng quang trong phản ứng. Cường độ huỳnh quang biểu thị nồng độ sản

phẩm PCR tạo thành. Phản ứng được xác định sau các điểm thời gian (hoặc các chu kỳ PCR) mà trong đó sự nhân bản trình tự đích sẽ được phát hiện đầu tiên. Giá trị này được biểu thị với tên gọi là ngưỡng chu kỳ C_t (cycle threshold), đây chính là thời điểm mà cường độ huỳnh quang lớn hơn giá trị huỳnh quang cơ sở. Lượng ADN đích được nhân bản càng nhiều thì tín hiệu phát huỳnh quang càng nhanh, do vậy mà giá trị C_t sẽ càng thấp.

Trong real-time PCR, người ta thường sử dụng các loại thuốc nhuộm liên kết ADN sợi đôi (SYBR Green) để phát huỳnh quang, và các probe hoặc primer đặc hiệu chuỗi (trình tự) được đánh dấu huỳnh quang (TaqMan PCR). Thiết bị ổn nhiệt chu kỳ (máy PCR) đặc biệt được gắn với một module phát hiện tín hiệu huỳnh quang để theo dõi tiến trình phản ứng khi sự khuếch đại xảy ra. Tín hiệu huỳnh quang đo được phản ánh số lượng sản phẩm được khuếch đại trong mỗi chu kỳ.

Trong phân tích định lượng ADN của sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen, cần thiết phải xác định một gen chuẩn - gen tham chiếu (là gen nội sinh của sinh vật chuyển gen) để chuẩn hóa phương pháp. Gen chuẩn này phải phù hợp với các điều kiện: i) trình tự có tính đặc hiệu cao; ii) có một bản sao duy nhất trong bộ gen đơn bội, iii) biểu hiện ổn định trong các dòng khác nhau của cùng một loài. Do vậy trong real-time PCR định lượng cần có hai loại phản ứng cho gen đích và cho gen tham chiếu. Đối với phương pháp này thì hiệu quả nhân bản của các mẫu chuẩn và các mẫu nghiên cứu được coi là như nhau.

Để dựng đường chuẩn của gen đích cần tách chiết ADN tổng số của mẫu chuẩn (là ADN tách chiết từ vật liệu chuẩn đã được chứng nhận như ADN của sinh vật biến đổi gen hay ADN plasmid mang trình tự gen đích) và mẫu đối chứng âm (vật liệu chuẩn đã biết không chứa trình tự gen đích).

Ví dụ: trong phân tích định lượng ADN từ các sản phẩm có nguồn gốc từ ngô chuyển gen Bt11, để dựng đường chuẩn của gen đích, ADN tổng số của ngô chuyển gen Bt11 (100% Bt là mẫu chuẩn đã được chứng nhận hợp lệ) và ngô không chuyển gen được tách chiết và định lượng. Pha loãng ADN của Bt11 thành các mẫu (M1-M6) mang số bản sao bộ gen đơn bội khác nhau như sau: M1: 20000; M2: 5000; M3: 1250; M4: 312; M5: 78; và M6: 19 (được biết bộ gen đơn bội của ngô có khối lượng 2,725 pg). Trộn ADN của Bt11 đã pha loãng với ADN của ngô không chuyển gen để đảm bảo lượng ADN ở mỗi mẫu là bằng nhau. Để dựng đường chuẩn của gen tham chiếu - *adh*1, ADN tổng số của ngô không chuyển gen được tách chiết, định lượng và pha loãng thành các mẫu (S1-S6) mang số bản sao bộ gen đơn bội khác nhau như sau: S1: 183486; S2: 61162; S3: 20387; S4: 6796; S5: 2265; và S6: 755 (được biết bộ gen đơn bội của ngô có khối lượng 2,725 pg).

Hiệu chỉnh và tính toán kết quả

Bằng cách sử dụng các mẫu đã được pha loãng với nồng độ đã biết để tạo ra một đường chuẩn cho cả gen chuẩn và gen đích. Đường chuẩn này thể hiện mối quan hệ tuyến tính giữa giá trị C_t và nồng độ ADN ban đầu, căn cứ vào đó có thể xác định được nồng độ ADN của các mẫu nghiên cứu căn cứ vào giá trị C_t của các mẫu này.

Đầu tiên, ta phải xây dựng được 2 đường chuẩn cho gen chuẩn và gen đích. Trong đó một cột sẽ là nồng độ ADN, và cột còn lại sẽ là số bản sao của gen đó.

Để định lượng tỷ lệ phần trăm sinh vật biến đổi gen đối với một mẫu, cần thiết phải xác định được 2 giá trị là số bản sao của gen đích và số bản sao của gen chuẩn.

Tỷ lệ phần trăm (%) sinh vật biến đổi gen (GM) trong một mẫu là tỷ lệ % của số bản sao gen đích so với số bản sao gen chuẩn, được tính bằng công thức sau:

Tỷ lệ % sinh vật biến đổi gen = (số bản sao của gen đích/số bản sao của gen chuẩn) x 100./.