МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32148— 2013

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Метод идентификации видовой принадлежности яиц птицы

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом птицеперерабатывающей промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИПП Россельхозакадемии) при участии Общества с ограниченной ответственностью «Компания «БИОКОМ» (ООО «Компания «БИОКОМ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004— 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2013 г. № 1525-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32148—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

5 Настоящий стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 54056—2010*

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

* Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2013 г. № 1525-ст ГОСТ Р 54056—2010 отменен с 1 июля 2015 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Метод идентификации видовой принадлежности яиц птицы

Foodstuffs of processed poultry eggs. Method for identification of poultry egg species

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые яичные продукты, выработанные из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы: жидкие и сухие яичный меланж, яичный желток, яичные полуфабрикаты и кулинарные изделия, и предназначен для качественной идентификации наличия в яичных продуктах яичного желтка и/или яичного меланжа из яиц кур (Gallus gallus), уток (Anas platyrhynchos), гусей (Anser anser), индейки (Meleagris gallopavo), цесарки (Numida meleagris), перепелов (Coturnix coturnix) и страусов (Struthio camelus) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Настоящий стандарт не распространяется на яичные продукты, содержащие только яичный белок.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения):

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 12.4.296 Система стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Респираторы фильтрующие. Общие технические условия

ГОСТ 3164 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 21240 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

Издание официальное

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 24104* Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 30363 Продукты яичные жидкие и сухие пищевые. Технические условия

ГОСТ 31655 Яйца пищевые (индюшиные, цесариные, перепелиные, страусиные). Технические условия

ГОСТ 31719 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

ГОСТ 31720 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.easc.by) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 30363, ГОСТ 31719, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **пищевые яйца (сельскохозяйственной птицы):** Яйца в скорлупе, произведенные сельскохозяйственной птицей, пригодные для непосредственного потребления человеком и переработки с целью получения продуктов питания.

Примечание — Пищевые яйца в зависимости от вида птицы могут подразделять, например, на куриное, перепелиное, индюшиное.

3.2 **пищевой продукт переработки яиц (сельскохозяйственной птицы):** Пищевой продукт, полученный в промышленных условиях в результате проведения комплекса технологических процессов и/или операций, изменяющих начальные свойства пищевого яйца сельскохозяйственной птицы.

3.3 **яичный меланж:** Пищевой продукт переработки яиц сельскохозяйственной птицы, полученный из яичной массы, прошедшей фильтрацию, гомогенизацию и пастеризацию.

3.4 **купажированный яичный меланж:** Яичный меланж заданного состава, полученный из яичной массы с добавлением яичного белка или яичного желтка.

3.5 **яичный желток [белок]:** Пищевой продукт переработки яиц сельскохозяйственной птицы, полученный из желточной [белковой] массы, прошедшей фильтрацию, гомогенизацию и пастеризацию.

3.6 **жидкий яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], выработанный без добавления или удаления воды.

3.7 **концентрированный яичный меланж [белок]:** Жидкий яичный меланж [белок], из которого частично удалена вода до достижения в нем установленной для данного продукта значения массовой доли сухих веществ, занимающей промежуточное положение между значениями данного показателя жидкого и сухого продуктов.

3.8 **охлажденный яичный меланж [белок, желток]:** Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], подвергнутый охлаждению, с температурой в толще продукта от 0 °С до 4 °С.

3.9 **замороженный яичный меланж [белок, желток]** (Нрк. *мороженый яичный продукт):* Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], подвергнутый замораживанию, с температурой в толще продукта не выше минус 12 °С.

---

* В Российской Федерации — по ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

3.10 **глубокозамороженный яичный меланж [белок, желток]:** Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], подвергнутый замораживанию, с температурой в толще продукта не выше минус 18 °С.

3.11 **сухой яичный меланж [белок, желток]** (Нрк. *сухой порошок):* Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], из которого удалена вода до достижения в нем значения массовой доли сухих веществ 95 % и более.

3.12 **ферментированный яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], полученный в результате воздействия ферментов с целью изменения его функциональных свойств.

3.13 **обессахаренный яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], полученный в результате применения технологических операций по удалению содержащихся в нем сахаров.

3.14 **подкисленный яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], полученный в результате применения технологических операций по введению в его состав регуляторов кислотности.

3.15 **полуфабрикат из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях непосредственно из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы в скорлупе или без нее, подготовленный к дальнейшей кулинарной обработке.

Примечания

1 Полуфабрикат из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть изготовлен с добавлением определенных рецептурой ингредиентов, например животного и/или растительного происхождения.

2 В зависимости от термической обработки полуфабрикат из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

3.16 **полуфабрикат из яичного меланжа [белка, желтка]:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях из яичного меланжа [белка, желтка], подготовленный к дальнейшей кулинарной обработке.

Примечания

1 Полуфабрикат из яичного меланжа [белка, желтка] может быть изготовлен с добавлением определенных рецептурой ингредиентов, например, животного и/или растительного происхождения.

2 В зависимости от термической обработки полуфабрикат из яичного меланжа [белка, желтка] может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

3.17 **кулинарное изделие из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях непосредственно из яиц сельскохозяйственной птицы в скорлупе или без нее, подвергнутый кулинарной обработке и готовый к употреблению.

Примечания

1 В зависимости от кулинарной обработки кулинарное изделие из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть, например, вареным, жареным.

2 В зависимости от термической обработки кулинарное изделие из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

3.18 **кулинарное изделие из яичного меланжа [белка, желтка]:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях из яичного меланжа [белка, желтка], подвергнутый кулинарной обработке и готовый к употреблению.

Примечания

1 В зависимости от кулинарной обработки кулинарное изделие из яичного меланжа [белка, желтка] может быть, например, вареным, жареным.

2 В зависимости от термической обработки кулинарное изделие из яичного меланжа [белка, желтка] может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

4 Сущность метода

Метод качественной идентификации наличия в яичных продуктах яичного желтка и/или яичного меланжа из яиц кур (Gallus gallus), уток (Anas platyrhynchos), гусей (Anser anser), индейки (Meleagris gallopavo), цесарки (Numida meleagris), перепелов (Coturnix coturnix) и страусов (Struthio camelus) осно-

ван на выявлении при помощи ПЦР фрагментов видоспецифичной ДНК, присутствие которых в яичном продукте однозначно свидетельствует о наличии в нем компонентов яиц определенного вида птиц. Методика выделения ДНК из пробы основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот на частицах сорбента (частицы окиси кремния размером от 20 до 50 мкм).

5 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности взвешивания не более ±0,001 г.

Приборы, оборудование, химическая посуда и материалы по ГОСТ 31719.

Лабораторный гомогенизатор.

Перчатки резиновые или латексные без пудры по [1] .

Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241.

Пробирки пластиковые вместимостью 15 $см^3$ с крышкой.

Скальпели медицинские по ГОСТ 21240.

Ступки фарфоровые с пестиками по ГОСТ 9147.

Шпатели одноразовые.

Спирт этиловый 95 %-ный, ректификованный по ГОСТ 5962.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Дезинфицирующие растворы, вызывающие деградацию ДНК.

Набор реагентов для выделения ДНК сорбционным методом по ГОСТ 31719.

Наборы реагентов для амплификации методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации с помощью электрофореза, включающие:

- пробирки амплификационные с лиофильно высушенной амплификационной смесью по ГОСТ 31719;
- ПЦР-растворитель по ГОСТ 31719;
- смесь праймеров (олигонуклеотидов) для амплификации целевых нуклеотидных последовательностей видоспецифичных фрагментов генома птиц:

а) курица:
   1) прямой: 5'-TCACATCGGACGAGGCCTA-3';
   2) обратный: 5'-GGAATGGGGTGAGTATGAGAGTT-3';

б) утка:
   1) прямой: 5'-TGCTCACTCTTATAGCAACTGCC-3';
   2) обратный: 5'-AGGCTCATTCTACCAGGGTCTGT-3';

в) гусь:
   1) прямой: 5'-CTCGCCTTCTCCTCAGTAGCTC-3';
   2) обратный: 5'-GGCAGTTGCTATTAGGGTGAGTAGG-3';

г) индейка:
   1) прямой: 5'-AACCTGAAATACAGGAGTAG-3';
   2) обратный: 5'-TAGGGTTAATGTGAGTAAG-3';

д) цесарка:
   1) прямой: 5'-ACACTAATAGCAACCGCTTTC-3';
   2) обратный: 5'-AGTTTGTTTGGAATTGAGCGG-3';

е) перепел:
   1) прямой: 5'-ATGTCCAATACGGATGACTA-3';
   2) обратный: 5'-AATAGGGCTAGGGTTAGGAG-3';

ж) страус:
   1) прямой: 5'-CCCTACATCGGACAAACCCT-3';
   2) обратный: 5'-GGTGATGCCAGCGATTACAA-3'.

Контрольный образец (К+), содержащий видоспецифичную ДНК (геномную ДНК или синтетический целевой фрагмент ДНК) птиц.

Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.

Набор реагентов для детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле по ГОСТ 31719.

Наборы реагентов для ПЦР в режиме реального времени, включающие:

- пробирки амплификационные с лиофильно высушенной амплификационной смесью состава по ГОСТ 31719 для проведения ПЦР в режиме реального времени;

- ПЦР-растворитель, содержащий интеркалирующий краситель SYBR Green по ГОСТ 31719;

- смесь праймеров (олигонуклеотидов) для амплификации целевых нуклеотидных последовательностей видоспецифичных фрагментов генома птиц:

а) курица:

1) прямой: 5'-TCACATCGGACGAGGCCTA-3';

2) обратный: 5'-GGAATGGGGTGAGTATGAGAGTT-3';

б) утка:

1) прямой: 5'-TGCTCACTCTTATAGCAACTGCC-3';

2) обратный: 5'-AGGCTCATTCTACCAGGGTCTGT-3';

в) гусь:

1) прямой: 5'-CTCGCCTTCTCCTCAGTAGCTC-3';

2) обратный: 5'-GGCAGTTGCTATTAGGGTGAGTAGG-3';

г) индейка:

1) прямой: 5'-AACCTGAAATACAGGAGTAG-3';

2) обратный: 5'-TAGGGTTAATGTGAGTAAG-3';

д) цесарка:

1) прямой: 5'-ACACTAATAGCAACCGCTTTC-3';

2) обратный: 5'-AGTTTGTTTGGAATTGAGCGG-3';

е) перепел:

1) прямой: 5'-ATGTCCAATACGGATGACTA-3';

2) обратный: 5'-AATAGGGCTAGGGTTAGGAG-3';

ж) страус:

1) прямой: 5'-CCCTACATCGGACAAACCCT-3';

2) обратный: 5'-GGTGATGCCAGCGATTACAA-3'.

Контрольный образец (К+), содержащий видоспецифичную ДНК (геномную ДНК или синтетический целевой фрагмент ДНК) птиц.

Допускается применение приборов и оборудования с техническими и средств измерений с метрологическими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Приготовление реагентов для выделения ДНК

Реагенты для выделения и очистки ДНК готовят по ГОСТ 31719.

6.2 Приготовление реагентов и агарозного геля для электрофореза

Приготовление реагентов и агарозного геля для электрофореза проводят по ГОСТ 31719.

6.3 Приготовление пробы

6.3.1 Отбор проб яиц проводят по ГОСТ 31655 и [2]. Отбор и подготовку лабораторных проб яичных продуктов проводят по ГОСТ 31720. При отборе проб, их транспортировании и хранении должны быть приняты меры, исключающие перекрестную контаминацию (загрязнение одного образца другим). Для этого отбор проб проводят в перчатках, а инструменты, применяемые для отбора и измельчения материала, используют однократно или обрабатывают моющими средствами и стерилизуют в пламени спиртовки или газовой горелки при переходе от пробы к пробе. Отбор проб проводят в чистую стеклянную или пластиковую посуду или одноразовые пластиковые пакеты.

Подготовку проб для анализа проводят в условиях ПЦР-лаборатории в зоне первичной обработки материала с соблюдением условий, указанных в ГОСТ 31719.

6.3.2 Подготовка проб яиц

Яйца в скорлупе разбивают и осторожно, не повреждая желток, отделяют основную массу яичного белка. Оставшиеся желтки тщательно перемешивают или гомогенизируют до однородной массы, не допуская вспенивания. Далее поступают по 6.3.3.

6.3.3 Подготовка проб жидких яичных продуктов

Содержимое тары с лабораторной пробой или каждой из доставленной потребительской тары с продуктом тщательно перемешивают при помощи одноразового шпателя. Затем отбирают из разных мест лабораторной пробы или из разных единиц потребительской тары по 1 $см^3$ продукта, переносят в одноразовую пластиковую пробирку вместимостью 15 $см^3$ и тщательно перемешивают, формируя объединенную пробу. Отбирают 1 $см^3$ объединенной пробы, помещают в одноразовую микропробирку вместимостью 1,5 $см^3$, маркируют и хранят до и после проведения анализа.

6.3.4 Подготовка проб сухих яичных продуктов

От доставленной лабораторной пробы отбирают не менее 10 порций по 5—10 г каждая, помещая их в одноразовый полиэтиленовый пакет размером 20 × 30 см, и перемешивают при помощи одноразового шпателя, формируя объединенную пробу 50—100 г. От полученной объединенной пробы отбирают порцию массой примерно 10 г, помещают в одноразовую, герметично закрывающуюся пробирку или контейнер, маркируют и хранят до проведения анализа. Если объединенная проба не является гомогенной, то отобранную от нее порцию предварительно растирают в фарфоровой ступке до однородного мелкодисперсного состояния.

6.3.5 Подготовка проб яичных полуфабрикатов и кулинарных изделий

От поступившего на исследование лабораторного образца (или продукта в потребительской таре) отбирают не менее 10 порций по 5—10 г каждая и измельчают в фарфоровой ступке. Измельченный материал 50—100 г помещают в одноразовый полиэтиленовый пакет размером 20 × 30 см, перемешивают при помощи одноразового шпателя. От объединенной пробы отбирают порцию массой примерно 10 г, помещают ее в одноразовую, герметично закрывающуюся пробирку или контейнер, маркируют и хранят до и после проведения анализа. Перед началом исследования маркированную пробу измельчают при помощи скальпеля (ножниц), помещают в фарфоровую ступку и растирают до однородного мелкодисперсного состояния.

6.4 Выделение и очистка ДНК

6.4.1 От приготовленных по 6.3.2—6.6.5 проб отбирают с помощью автоматического дозатора 100—150 $мм^3$ жидкого яичного меланжа или 50—100 $мм^3$ жидкого яичного желтка или с помощью одноразового шпателя отбирают 75—100 $мм^3$ (по насыпному объему) сухого яичного продукта или 100—150 $мм^3$ (по насыпному объему) яичного полуфабриката или кулинарного изделия, и помещают в одноразовую микропробирку вместимостью 1,5 $см^3$, которую затем маркируют. Для каждой пробы готовят три параллельные пробирки с яичным продуктом.

Минимальная масса отобранной для выделения ДНК пробы: сухие яичные продукты — 15 мг, жидкие яичные продукты, яичные полуфабрикаты или кулинарные изделия — 50 мг. При необходимости отбираемый объем пробы предварительно оценивают с помощью взвешивания с записью результата в миллиграммах.

6.4.2 Лизис клеток, сорбцию и очистку ДНК проводят по ГОСТ 31719 в пробирках с подготовленной по 6.3.5 пробой.

6.4.3 Приготовленный по 6.4.2 очищенный экстракт ДНК переносят в чистую микропробирку, не задевая при этом осадка, поскольку попадание в нее сорбента может в дальнейшем приводить к ингибированию ПЦР. Полученный экстракт ДНК используют для проведения амплификации и при необходимости хранят при температуре 4 °С не более 1 мес или при температуре минус 18 °С не более одного года.

6.4.4 В чистую микропробирку отбирают 0,03—0,08 $см^3$ ТЕ-буфера (элюирующего раствора) по ГОСТ 31719 и используют при проведении амплификации в качестве контрольной отрицательной пробы (проба К-).

7 Проведение анализа

Для выявления фрагментов видоспецифичной ДНК растений и животных используют наборы реагентов для амплификации методом ПЦР, содержащие праймеры 4, специфичные к ДНК определенного вида птиц.

7.1 Амплификация фрагментов видоспецифичной ДНК птиц с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза

7.1.1 В штативе размещают и маркируют необходимое число микропробирок с лиофильно высушенной амплификационной ПЦР-смесью по ГОСТ 31719 (три пробирки для каждой пробы), включая пробирки для положительного и отрицательного контролей.

7.1.2 В каждую микропробирку с ПЦР-смесью при помощи автоматического дозатора по ГОСТ 31719 последовательно вносят 10 мм^3 ПЦР-растворителя по ГОСТ 31719 и 5 мм^3 смеси праймеров 4 для выявления фрагмента видоспецифичной ДНК птиц. Перед использованием смесь праймеров необходимо разморозить в твердотельном термостате по ГОСТ 31719 при температуре 4 °С, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 5—10 с, а затем собрать осаждением на дно микропробирки путем центрифугирования на микроцентрифуге-встряхивателе по ГОСТ 31719 при 2000 об/мин в течение 3—5 с. Последующую работу с праймерами рекомендуется проводить при температуре от 2 °С до 4 °С с использованием твердотельного термостата с охлаждением по ГОСТ 31719.

7.1.3 В микропробирку с ПЦР-смесью для отрицательного контрольного образца вносят 5 мм^3 ТЕ-буфера (отрицательная контрольная проба К-), подготовленного по 6.1. Затем в микропробирки с ПЦР-смесью добавляют по 5 мм^3 экстракта ДНК (6.4.2) (три пробирки для каждого из исследуемых образцов). В последнюю очередь в микропробирку с ПЦР-смесью для положительного контрольного образца вносят 0,005 см^3 положительной контрольной пробы (К+).

7.1.4 Содержимое микропробирок растворяют путем легкого перемешивания на микроцентрифуге-встряхивателе. После этого собирают осаждением капли ПЦР-смеси со стенок микропробирок путем центрифугирования на микроцентрифуге-встряхивателе по ГОСТ 31719 при 2000 об/мин в течение 3—5 с.

7.1.5 Если для проведения амплификации используется амплификатор без нагреваемой крышки, то в каждую микропробирку добавляют по 0,020—0,025 см^3 (две капли) вазелинового масла.

7.1.6 Плотно закрытые микропробирки центрифугируют в течение 5—7 с на микроцентрифуге-встряхивателе при 2000 об/мин и помещают в амплификатор по ГОСТ 31719 для проведения амплификации по программе, указанной в таблице 1. По окончании действия программы пробирки извлекают из амплификатора и в штативе передают на этап детекции продуктов ПЦР методом электрофореза.

Таблица 1 — Программа амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК птиц (ПЦР с детекцией методом электрофореза)

Этап программы	Режим амплификации		Процесс	Число циклов
	Температура, °С	Время, с		
1	94	180	Денатурация ДНК	1
2	94	30	Денатурация ДНК	40
	65	40	Отжиг праймеров	
	72	20	Синтез ДНК	
3	72	180	Синтез ДНК	1

Примечание — Использование амплификаторов различных моделей может потребовать изменения времени каждого шага и/или изменения температуры отжига праймеров на 1 °С—2 °С.

7.2 Амплификация фрагментов видоспецифичной ДНК птиц с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (RT-ПЦР)

7.2.1 В штативе размещают и маркируют необходимое количество микропробирок с лиофильно высушенной амплификационной ПЦР-смесью по ГОСТ 31719 (для RT-ПЦР) — не менее трех пробирок для одной пробы, а также микропробирки для отрицательной (К-) и положительной (К+) проб. В случае исследования многокомпонентных продуктов число микропробирок на одну пробу рассчитывают, исходя из того, какое число видов птицы планируется идентифицировать.

7.2.2 В каждую микропробирку с ПЦР-смесью (для RT-ПЦР) при помощи автоматического дозатора вносят 10 мм^3 ПЦР-растворителя по ГОСТ 31719, содержащего интеркалирующий растворитель SYBR Green и 10 мм^3 смеси праймеров 4 для выявления фрагмента ДНК определенного вида птицы. Перед использованием смесь праймеров готовят по 7.1.2.

7.2.3 В микропробирку с ПЦР-смесью для К- вносят 10 мм^3 ТЕ-буфера (элюирующего раствора), подготовленного по 6.1. Затем в микропробирки с ПЦР-смесью (для RT-ПЦР) добавляют по 5 мм^3 экстракта ДНК (6.4.2) каждого из исследуемых образцов. В последнюю очередь в микропробирку с ПЦР-смесью для положительного контрольного образца вносят 0,005 см^3 положительного контроля К+. Содержимое пробирок растворяют путем легкого перемешивания на микроцентрифуге-встряхивателе по ГОСТ 31719. После этого собирают осаждением капли ПЦР-смеси со стенок пробирок путем центрифугирования на микроцентрифуге-встряхивателе при 2000 об/мин в течение 3—5 с.

7.2.4 Если конструкция используемой модели амплификатора (ГОСТ 31719) требует проведения ПЦР в специальных пробирках-контейнерах, то полученное после растворения и перемешивания содержимое пробирок для амплификации полностью переносят в такие контейнеры.

7.2.5 Плотно закрытые микропробирки центрифугируют 5—7 с на микроцентрифуге-встряхивателе при 2000 об/мин и помещают в амплификатор для проведения амплификации по программе, указанной в таблице 2.

Таблица 2 — Программа амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК разных видов птицы (RT-ПЦР с детекцией в режиме реального времени)

Этап программы	Режим амплификации		Процесс	Число циклов
	Температура, °С	Время, с		
1	94	180	Денатурация ДНК	1
2	94	20	Денатурация ДНК	40
	65	20	Отжиг праймеров	
	70	20	Синтез ДНК	
Примечание — Использование амплификаторов с нагревающейся крышкой может потребовать уменьшения температуры отжига праймеров и элонгации на 1 °С — 2 °С. На шаге «Синтез ДНК» включается оптика для измерения флуоресценции красителя (в реальном времени), рабочим каналом является № 1 (для красителя FAM или SYBR Green длины волны возбуждения/измерения равны 494/519 нм), номер канала у разных приборов может отличаться (см. инструкцию к прибору).				

7.2.6 Проводят регистрацию результатов ПЦР в соответствии с инструкцией к используемой модели амплификатора по ГОСТ 31719 для проведения RT-ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

8 Детекция (обнаружение) продуктов амплификации

8.1 Детекцию продуктов амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК методом электрофореза проводят по ГОСТ 31719*.

Регистрацию и документирование полученных результатов путем занесения в базу данных компьютера осуществляют при помощи системы для документирования гелей по ГОСТ 31719 в соответствии с прилагаемым к ней техническим описанием.

8.2 Детекцию продуктов амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК птиц в режиме реального времени проводят по ГОСТ 31719**.

Результаты качественного анализа отображаются с помощью программного обеспечения прибора в виде кривых флюоресценции и в виде табличных данных, содержащих количество циклов *log*-фазы (ГОСТ 31719), полученных для анализируемых проб, а также отрицательной (К–) и положительной (К+) проб.

9 Обработка результатов анализа

9.1 ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза

Оценку результатов анализа проводят визуально сравнением взаимного расположения на электрофореграммах анализируемой пробы и контрольных проб полос, соответствующих видоспецифичному фрагменту ДНК птиц, полученному в реакции с положительным контролем К+.

* Детекцию данным методом проводят в случае анализа по 7.1.

** Детекцию данным методом проводят в случае анализа по 7.2.

Положительными, то есть содержащими видоспецифичный фрагмент ДНК, считаются пробы, содержащие светящиеся полосы на электрофореграммах не менее чем двух из трех параллельных проб и расположенные на таком же расстоянии от старта, что и полоса, соответствующая положительной контрольной пробе К+. При этом на электрофореграмме отрицательной контрольной пробы К– соответствующая полоса должна отсутствовать.

Если светящаяся полоса видоспецифического фрагмента ДНК присутствует только на электрофореграмме одной параллельной пробы, а на двух других отсутствует, а также в случае отсутствия полосы фрагмента ДНК на электрофореграмме пробы К+ и/или присутствия полосы на фореграмме пробы К-, то результат считается сомнительным. В этом случае необходимо провести повторную амплификацию с анализируемым экстрактом ДНК. Если удовлетворительный результат не будет достигнут и в этом случае, то необходимо провести повторный анализ, начиная с выделения ДНК из новой пробы исследуемого яичного продукта.

9.2 RT-ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

Оценку результатов анализа проводят визуально сравнением кривых флюоресценции для анализируемых проб и контрольных проб К- и К+, а также по значениям циклов *log*-фазы.

Положительными, то есть содержащими видоспецифичный фрагмент ДНК, считаются пробы, для которых в процессе амплификации наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции (кривая флуоресценции имеет S-образную форму) и количество циклов log-фазы имеет конечное значение (не более 40). При этом должны выполняться следующие условия: для всех положительных проб К+ должно наблюдаться увеличение интенсивности флуоресценции и кривая флуоресценции должна иметь S-образную форму; в контрольных отрицательных пробах К- не должно происходить накопление продуктов ПЦР, поэтому график флуоресценции для всех этих проб должен иметь вид прямой линии. При нарушении хотя бы одного из этих условий необходимо провести повторную амплификацию с анализируемым экстрактом ДНК. Если удовлетворительный результат не будет достигнут и в этом случае, то необходимо провести повторный анализ, начиная с выделения ДНК из новой пробы исследуемого яичного продукта.

9.3 Оформление результатов анализа

При положительной детекции продуктов амплификации в протоколе испытаний указывают: «Видоспецифичный фрагмент ДНК [вид птицы] — обнаружен».

10 Требования к условиям проведения анализа

Устройство лаборатории для проведения анализа методом ПЦР, условия и процедура анализа должны удовлетворять требованиям ГОСТ 31719 и [2].

11 Требования к квалификации оператора

К проведению анализа допускаются специалисты, удовлетворяющие требованиям ГОСТ 31719 и [2].

12 Требования безопасности

12.1 При выполнении всех работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

12.2 Помещение должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

12.3 При работе с электроустановками требования к безопасности должны соответствовать ГОСТ 12.1.019.

12.4 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.4.296 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

Библиография

[1] ISO 11193-1:2008 Single-use Medical examination gloves — Part 1: Specification for gloves made from rubber latex or rubber solution (Перчатки медицинские одноразового применения. Часть 1. Требования к перчаткам из каучукового латекса или смесей на основе каучука)

[2] ISO 24276:2006 Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions (Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения)

УДК 637.544:006.354 МКС 67.120.20

Ключевые слова: сухие и жидкие яичные продукты, яичные полуфабрикаты, яичные кулинарные изделия, идентификация наличия яиц, метод полимеразной цепной реакции, фрагмент ДНК птиц

Редактор *Д.А. Кожемяк*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 12.11.2019. Подписано в печать 25.11.2019 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86 Уч.-изд. л. 1,19.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31. к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru