ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52173— 2003

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением «Научно-исследовательский институт питания РАМН» (ГУ «НИИ питания РАМН»), Центром «Биоинженерия» РАН

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 декабря 2003 г. № 402-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июль 2020 г.

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.gost.ru)

© ИПК Издательство стандартов, 2004
© Стандартинформ, оформление, 2020

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

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Определения . . . 2
4 Аппаратура, материалы и реактивы . . . 2
5 Отбор проб . . . 4
6 Подготовка к проведению анализа . . . 4
7 Проведение анализа . . . 6
8 Обработка результатов анализа . . . 8
9 Контроль результатов идентификации . . . 8
10 Требования безопасности . . . 8
Приложение А (обязательное) Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (промотор *35S*) . . . 9
Приложение Б (обязательное) Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (терминатор *nos*) . . . 10
Библиография . . . 11

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

Raw material and food-stuffs.
Method for the identification of genetically modified organisms (GMO) of plant origin

Дата введения — 2005—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые сырье и продукты (далее — продукт) и устанавливает метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения.

Метод основан на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующими праймерами.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

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 вентилляционные. Общие требования

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3164 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9656 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 12738 Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия

ГОСТ 20015 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 21400 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 24104 Весы лабораторные. Общие технические требования[1)]

[1)] Действует ГОСТ Р 53228—2008 «Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

Издание официальное

ГОСТ 26678 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

ГОСТ Р 51652 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия[1)]

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **генетически модифицированные источники пищи:** Продукты (компоненты), используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде, полученные из генетически модифицированных организмов.

3.2 **генетически модифицированный организм:** Организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии или содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинацию генов.

3.3 **генная инженерия:** Совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Амплификатор типа «Терцик МС-2» под микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 $см^3$ со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее 1,5 °С/с [1].

4.2 Прибор для горизонтального электрофореза типа «Mini-Sub Cell GT System» с комплектом кювет и гребенок [2].

4.3 Источник напряжения типа «Power Pac 300» с диапазоном регулируемого напряжения 50—300 В [3].

4.4 Видеосистема типа «Gel Doc 2000™», предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминисцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием: диапазон излучения 300—400 нм, чувствительность — не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию) [4].

4.5 Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

4.6 Камера морозильная, обеспечивающая температуру минус 20 °С.

4.7 Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 12 000 $мин^{-1}$) [5].

4.8 Термостат типа «TERMO 24-15» под микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 $см^3$, диапазон температур от 15 °С до 120 °С, количество гнезд — не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры — 0,2 °С, разность температур между соседними ячейками — не более 0,5 °С [6].

4.9 Аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения 250—3000 $мин^{-1}$.

4.10 Печь микроволновая (мощностью не менее 400 Вт).

4.11 Весы лабораторные общего назначения высокого класса точности [условное обозначение Ⓘ] с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

[1)] Действует ГОСТ 5962—2013.

4.12 Баня водяная [7].

4.13 pH-метр с набором электродов, с погрешностью ± 0,1 pH.

4.14 Дозаторы с переменным объемом дозирования:

0,2—2,0 мм^3, шагом 0,01 мм^3, точностью ± 1,2 %;

0,5—10,0 мм^3, шагом 0,01 мм^3, точностью ± 0,8 %;

2—20 мм^3, шагом 0,01 мм^3, точностью ± 0,8 %;

20—200 мм^3, шагом 0,1 мм^3, точностью ± 0,6 %;

100—1000 мм^3, шагом 1 мм^3, точностью ± 3 %;

2—10 см^3, шагом 0,1 см^3, точностью ± 0,5 %.

4.15 Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см^3.

4.16 Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10; 20; 200; 1000 мм^3; 10 см^3.

4.17 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 25; 50; 100; 200; 1000 см^3 по ГОСТ 12738.

4.18 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные на 25; 100; 1000 см^3 по ГОСТ 1770.

4.19 Пестик тефлоновый или стеклянная палочка по ГОСТ 21400 под размер микроцентрифужной пробирки вместимостью 1,5 см^3.

4.20 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.21 Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

4.22 Кислота борная по ГОСТ 9656, х. ч.

4.23 Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), х. ч. [8].

4.24 Гексадецилтриметиламмониум бромид [9].

4.25 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

4.26 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

4.27 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652, х. ч.

4.28 Спирт изопропиловый, х. ч. [10].

4.29 Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.

4.30 Хлороформ по ГОСТ 20015, х. ч.

4.31 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.32 Вода деионизированная [11].

4.33 Трис (оксиметил) аминометан, х. ч. [12].

4.34 2-меркаптоэтанол, х. ч. [13].

4.35 Этидий бромистый, х. ч. [14].

4.36 Альбумин бычий сывороточный сухой (БСА) [15].

4.37 Термостабильный фермент Taq-полимераза, оптимум работы в области 70 °С — 72 °С [16].

4.38 ПЦР буфер [17].

4.39 Агароза для электрофореза (тип II) [18].

4.40 Маркер молекулярной массы ДНК [19].

4.41 Стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0) [20].

4.42 Стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5) [21].

4.43 Нуклеотиды:

2′-дезоксиаденозин-5′ трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (АТФ) [22];

2′-дезоксицитидин-5′ трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ) [23];

2′-дезоксигуанозин-5′ трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ГТФ) [24];

2′-дезокситимидин-5′ трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ТТФ) [25].

4.44 Праймеры на промотор *35S* [26]:

35S-1 5′GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3′;

35S-2 5′GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3′.

4.45 Праймеры на терминатор *nos* [27]:

nos-1 5′GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3′;

nos-2 5′TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3′.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования с техническими характеристиками не хуже указанных выше.

5 Отбор проб

Отбор проб проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевого сырья и пищевых продуктов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление раствора концентрацией *c* (Трис-HCl) = 1 моль/дм^3

В мерную колбу по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см^3 помещают 12,11 г Трис (оксиметил) аминометана по 4.33, [12], растворяют в приблизительно 80 см^3 деионизированной воды по 4.32, [11]. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5, затем доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Срок хранения в холодильнике по ГОСТ 26678 при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.2 Приготовление раствора концентрацией *c* (NaCl) = 5 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 29,22 г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в приблизительно 80 см^3 деионизированной воды, доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.3 Приготовление раствора концентрацией *c* (NaOH) = 30 %

В колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 50 см^3 помещают 3 г гидроокиси натрия по ГОСТ 4328, растворяют в 7 см^3 деионизированной воды. Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.4 Приготовление раствора концентрацией *c* (ЭДТА) = 0,5 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 14,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты по 4.23, [8], растворяют в приблизительно 80 см^3 деионизированной воды. Раствором гидроокиси натрия, приготовленным по 6.1.3, доводят pH раствора до 8,0, деионизированной водой доводят до метки и перемешивают.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.5 Приготовление лизирующего буфера

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 25 см^3 помещают 0,5 г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 10 см^3 деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 2,5 см^3 раствора Трис-HCl, приготовленного по 6.1.1, 7 см^3 раствора хлористого натрия, приготовленного по 6.1.2, 1 см^3 раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.4, доводят деионизированной водой до метки, перемешивают.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес. В случае выпадения осадка при хранении раствор выдерживают при комнатной температуре или подогревают в термостате по 4.8, [6] при температуре 65 °С до полного растворения.

Непосредственно перед использованием в приготовленный раствор добавляют автоматическим микродозатором меркаптоэтанол по 4.34, [13] из расчета 4 мм^3 на 1 см^3 лизирующего буфера и перемешивают.

6.1.6 Приготовление хлороформа, насыщенного водой

В колбу вместимостью 200 см^3 вносят цилиндром по ГОСТ 1770 100 см^3 хлороформа по ГОСТ 20015, добавляют 20 см^3 деионизированной воды по ГОСТ 6709, тщательно перемешивают и оставляют на 24 ч для насыщения.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.7 Приготовление 70%-ного раствора этилового ректификованного спирта

В колбу вместимостью 200 см^3 вносят цилиндром 70 см^3 96%-ного этилового ректификованного спирта по ГОСТ Р 51652, добавляют 26 см^3 деионизированной воды и перемешивают.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.8 Приготовление раствора концентрацией *c* (БСА) = 20 мкг/см^3

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 см^3 помещают 0,002 г сухого БСА по 4.36, [15], добавляют 1 см^3 деионизированной воды, перемешивают до полного растворения. Отбирают 10 мм^3 приготовленного раствора и переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 см^3, добавляют 1 см^3 деионизированной воды и перемешивают.

Срок хранения в морозильной камере при температуре минус 20 °С — не более 1 мес.

6.1.9 Приготовление смеси нуклеотидов концентрацией *с* = 4 ммоль/дм^3

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,2 см^3 вносят 96 мм^3 деионизированной воды, 1 мм^3 АТФ (концентрацией 100 ммоль/дм^3) по 4.43, [22], 1 мм^3 ГТФ (концентрацией 100 ммоль/дм^3) по 4.43, [24], 1 мм^3 ЦТФ (концентрацией 100 ммоль/дм^3) по 4.43, [23], 1 мм^3 ТТФ (концентрацией 100 ммоль/дм^3) по 4.43, [25], смесь перемешивают.

Срок хранения при температуре минус 20 °С — не более одного года.

6.1.10 Приготовление 1×ТВЕ буфера для электрофореза

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 10,8 г Трис (оксиметил) аминометана, 5,5 г борной кислоты по ГОСТ 9656 и 0,92 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.1.11 Приготовление раствора концентрацией *с* ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 10 мг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1 г бромистого этидия по 4.35, [14], растворяют и доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 12 мес.

6.1.12 Приготовление 2%-ного агарозного геля

6.1.12.1 В плоскодонную стеклянную колбу вместимостью не менее 200 см^3 помещают 1 г агарозы по 4.39, [18], добавляют 50 см^3 буфера 1×ТВЕ, приготовленного по 6.1.10, тщательно перемешивают взбалтыванием. Колбу со смесью нагревают в микроволновой печи по 4.10 или на водяной бане при температуре 100 °С и кипятят до полного расплавления агарозы.

6.1.12.2 Расплавленную агарозу, приготовленную по 6.1.12.1, охлаждают при комнатной температуре до 50 °С, автоматическим микродозатором добавляют 5 мм^3 раствора бромистого этидия, приготовленного по 6.1.11, тщательно перемешивают круговыми движениями.

6.1.12.3 Однородную смесь, полученную по 6.1.12.2, разливают в кюветы для электрофореза и с помощью гребенки формируют карманы. Через 15—30 мин после остывания геля гребенку удаляют.

Допускается хранение геля в 1×ТВЕ буфере для электрофореза, приготовленного по 6.1.10, в холодильнике при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 7 сут.

6.2 Подготовка пробы

6.2.1 Две навески анализируемого продукта, навеску стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0) по 4.41, [20] и навеску стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5) по 4.42, [21] массой от 70 до 80 мг каждая помещают в четыре микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 см^3. С помощью дозатора добавляют в каждую по 200 мм^3 лизирующего буфера с меркаптоэтанолом по 6.1.5 и немедленно тефлоновым пестиком растирают смесь до получения однородной массы. В каждую микроцентрифужную пробирку добавляют по 600 мм^3 лизирующего буфера с меркаптоэтанолом. Смесь тщательно перемешивают тефлоновым пестиком, не допуская образования комков. Затем смесь перемешивают в течение 30 с на аппарате для встряхивания типа «Вортекс».

6.2.2 Приготовленные по 6.2.1 смеси помещают в термостат, инкубируют при температуре 65 °С 40—60 мин, после чего повторно перемешивают 30 с на аппарате для встряхивания и центрифугируют 7 мин на настольной микроцентрифуге типа Эппендорф по 4.7, [5] при частоте вращения 12 000—13 000 мин$^{-1}$.

6.2.3 Надосадочную жидкость приготовленных по 6.2.2 смесей переносят в четыре чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см^3, не захватывая частицы суспензии из осадка. Затем в каждую микроцентрифужную пробирку добавляют по 400 мм^3 хлороформа, приготовленного по 6.1.6, перемешивают на аппарате для встряхивания 30 с до образования суспензии. Полученные суспензии центрифугируют 7 мин на настольной микроцентрифуге типа Эппендорф при частоте вращения 12 000 мин$^{-1}$ при комнатной температуре.

6.2.4 Верхние слои (водные фазы), приготовленные по 6.2.3, из четырех пробирок переносят в четыре чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см^3, не захватывая слой хлороформа. Экстракцию хлороформом и центрифугирование по 6.2.3 повторяют дважды.

6.2.5 Верхние слои (водные фазы), приготовленные по 6.2.4, переносят в четыре чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см^3, добавляют в каждую из них по 600 мм^3 изопропилового спирта по 4.28, [10], предварительно охлажденного в морозильной камере до температуры минус 20 °С, и перемешивают на аппарате для встряхивания 30 с.

Полученные смеси помещают в морозильную камеру температурой минус 20 °С не менее чем на 30 мин для образования осадка дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

На данном этапе допускается хранение полученных смесей до 12 ч в морозильной камере при температуре минус 20 °С.

6.2.6 Смеси, приготовленные по 6.2.5, центрифугируют 6 мин при частоте вращения 12 000 мин$^{-1}$ при комнатной температуре. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость. Каждый осадок 2—3 раза промывают 200 мм^3 70%-ного этилового ректификованного спирта, приготовленного по 6.1.7, каждый раз перемешивая осадки на аппарате для встряхивания 15—20 с и центрифугируя их на микроцентрифуге 6 мин при частоте вращения 12 000 мин$^{-1}$. Тщательно (до последней капли) удаляют надосадочную жидкость.

6.2.7 Осадки, приготовленные по 6.2.6, растворяют в 50—100 мм^3 деионизированной воды и получают раствор ДНК.

Растворы ДНК, приготовленные по 6.2.7, непосредственно используют для проведения ПЦР или хранят при температуре минус 20 °С сроком до одного года в морозильной камере.

6.3 Приготовление реакционных смесей № 1 и № 2

6.3.1 Приготовление реакционной смеси № 1 на пять проб

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см^3, помещенную в кювету со льдом, вносят 312,5 мм^3 деионизированной воды, 52,5 мм^3 10× буфера для ПЦР с хлоридом магния по 4.38, [17], 26 мм^3 смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9, 13 мм^3 праймера на промотор *35S*-1 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.44, [26], 13 мм^3 праймера на промотор *35S*-2 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.44, [26], 2,5 мм^3 фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм^3) по 4.37, [16], 52,5 мм^3 раствора БСА, приготовленного по 6.1.8. Смесь перемешивают 5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены или пузырьков.

6.3.2 Приготовление реакционной смеси № 2 на пять проб

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см^3, помещенную в кювету со льдом, вносят 312,5 мм^3 деионизированной воды, 52,5 мм^3 10× буфера для ПЦР с хлоридом магния, 26 мм^3 смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9, 13 мм^3 праймера на терминатор *nos*-1 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.45, [27], 13 мм^3 праймера на терминатор *nos*-2 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.45, [27], 2,5 мм^3 фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм^3), 52,5 мм^3 раствора БСА, приготовленного по 6.1.8. Смесь перемешивают 5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены или пузырьков.

6.3.3 Реакционные смеси № 1 и № 2, приготовленные по 6.3.1 и 6.3.2, центрифугируют на настольной микроцентрифуге 30 с при частоте вращения 3000 мин$^{-1}$. Реакционную смесь № 1 разливают по 90 мм^3 в пять микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см^3 (или 0,5 см^3 в зависимости от типа используемого амплификатора) для проведения ПЦР. Реакционную смесь № 2 разливают по 90 мм^3 в пять других микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см^3 (или 0,5 см^3 в зависимости от типа используемого амплификатора) для проведения ПЦР. Реакционные смеси № 1 и № 2 готовят непосредственно перед проведением ПЦР.

7 Проведение анализа

7.1 В первые две пробирки с реакционной смесью № 1 и в первые две пробирки с реакционной смесью № 2 добавляют автоматическим микродозатором раствор ДНК, выделенной из анализируемого продукта, приготовленный по 6.2.1—6.2.7, по 2 мм^3 в каждую.

В третью пробирку с реакционной смесью № 1 и в третью пробирку с реакционной смесью № 2 добавляют автоматическим микродозатором раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0), по 2 мм^3 в каждую.

В четвертую пробирку с реакционной смесью № 1 и в четвертую пробирку с реакционной смесью № 2 добавляют автоматическим микродозатором раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), по 2 мм^3 в каждую.

В пятую пробирку с реакционной смесью № 1 и в пятую пробирку с реакционной смесью № 2 автоматическим микродозатором добавляют деионизированную воду по 2 мм^3 в каждую — холостой опыт.

7.2 В каждую пробирку со смесью по 7.1 добавляют, не перемешивая, по одной капле (20—40 мм^3) вазелинового масла по ГОСТ 3164.

7.3 Пробирки со смесями, подготовленными по 7.2, помещают в амплификатор для проведения ПЦР. Программа амплификации для праймеров на промотор *35S* приведена в таблице 1, на терминатор *nos* — в таблице 2.

Таблица 1 — Условия амплификации для *35S* промотора

Стадия	Тип амплификатора				
	Crocodile II	Gene Amp 2400	Progene	Trio	Терцик МС-2
Денатурация	2 мин/98 °С	3 мин/94 °С	3 мин/95 °С	2 мин/96 °С	3 мин/94 °С
Амплификация	8 с/95 °С 30 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С	36 с/95 °С 72 с/54 °С 84 с/72 °С	30 с/95 °С 40 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	40	40	40	40	40
Конечное удлинение	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С
Фаза остывания	1 мин/30 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С
Скорость нагрева	1 °С/с	0,77 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	0,77 °С/с
Скорость остывания	1 °С/с	3,15 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	3,15 °С/с

Таблица 2 — Условия амплификации для терминатора *nos*

Стадия	Тип амплификатора				
	Crocodile II	Gene Amp 2400	Progene	Trio	Терцик МС-2
Денатурация	3 мин/95 °С	3 мин/94 °С	3 мин/95 °С	2 мин/98 °С	3 мин/94 °С
Амплификация	20 с/95 °С 40 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С	36 с/95 °С 72 с/54 °С 84 с/72 °С	30 с/95 °С 40 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	40	40	40	40	40
Конечное удлинение	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С
Фаза остывания	1 мин/30 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С
Скорость нагрева	1 °С/с	0,77 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	0,77 °С/с
Скорость остывания	1 °С/с	3,15 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	3,15 °С/с

7.4 По окончании ПЦР из каждой микроцентрифужной пробирки осторожно из-под слоя вазелинового масла отбирают по 8 мм^3 смеси и переносят в отдельный карман геля, приготовленного по 6.1.12.

7.5 В отдельный карман геля вносят 8 мм^3 маркера молекулярной массы ДНК по 4.40, [19].

7.6 Гель помещают в камеру прибора по 4.2, [2] для проведения горизонтального электрофореза, заполненную буфером 1× ТБЕ.

Электрофорез проводят при напряженности электрического поля 6 В/см геля в условиях стабилизации напряжения в течение 65 мин.

7.7 Визуализацию продуктов ПЦР после электрофореза осуществляют с помощью видеосистемы по 4.4, [4].

7.8 Результат идентификации в виде файл-паспорта сохраняется на жестком магнитном носителе и может быть выведен на видеомонитор или принтер. Примеры изображений приведены в приложениях А и Б.

8 Обработка результатов анализа

8.1 В пробе со стандартом ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), содержащего промотор *35S*] должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 195 пар нуклеотидов (п. н.). В пробе со стандартом без ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)] и в холостом опыте не должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 195 пар нуклеотидов (п. н.).

8.2 В пробе со стандартом ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), содержащего терминатор *nos*] должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 180 п. н. В пробе со стандартом без ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения состава (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)] и в холостом опыте не должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 180 п. н.

8.3 Интерпретация результатов

8.3.1 Отсутствие в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н. свидетельствует об отсутствии генетически модифицированных источников в анализируемом продукте.

8.3.2 Обнаружение в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н. или одного из них свидетельствует о наличии генетически модифицированных источников в анализируемом продукте.

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

8.3.4 Обнаружение в отрицательных контролях ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н. свидетельствует о получении ложноположительного результата. Это возможно при загрязнении ГМИ оборудования и/или реактивов. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и дозаторов раствором соляной кислоты (1 моль/дм^3), заменить реактивы на свежеприготовленные, повторить амплификацию.

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

9 Контроль результатов идентификации

Для контроля результатов идентификации используют положительный контроль — раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), и два отрицательных контроля — холостой опыт и раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0).

10 Требования безопасности

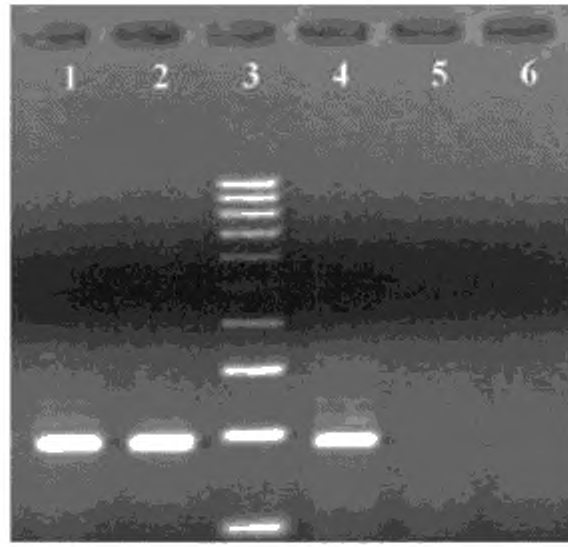
10.1 При выполнении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007. При работе с раствором бромистого этидия и окрашенным гелем необходимо работать в резиновых перчатках.

10.2 Помещение, в котором проводятся работы, 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.

10.3 При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.019. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. При работе с УФ-излучением необходимо пользоваться защитным экраном и защитными очками.

Приложение А
(обязательное)

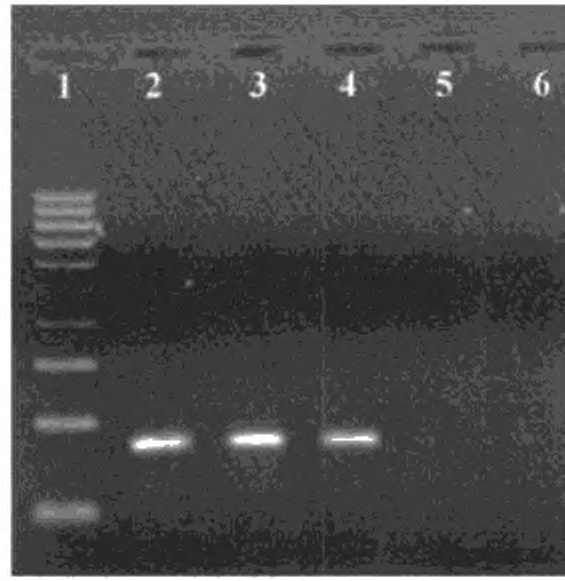
Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (промотор *35S*)



1, 2 — анализируемые пробы; 3 — маркер молекулярной массы 100 п. н.; 4 — стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения; 5 — стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения; 6 — холостой опыт

Приложение Б
(обязательное)

Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (терминатор *nos*)



1 — маркер молекулярной массы 100 п. н.; 2, 3 — анализируемые пробы; 4 — стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения; 5 — стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения; 6 — холостой опыт

Библиография

[1]	ТУ 9642-001-4648062—98	Амплификатор «Терцик МС-2»
[2]	«Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170-4406	Камера для электрофореза «Mini-Sub Cell GT System»
[3]	«Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 900-7980	Источник напряжения «Power Pac 300»
[4]	«Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170-86-16	Видеосистема «Gel Doc 2000™ Gel Documentation System»
[5]	ТУ 9452-007-18240041—00	Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф «ТЭТА», 12 000 $мин^{-1}$
[6]	ТУ 9452-001-18240041—99	Термостат «TERMO 24-15»
[7]	ТУ 46-22-603—75	Баня водяная с электрическим или огневым подогревом
[8]	ТУ 113-04-146—84	Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)
[9]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № H 5882	Гексадецилтриметиламмониум бромид [$C_{19}H_{42}NBr$]
[10]	ТУ 6-09-402—85	Спирт изопропиловый [$CH_3CHOH\ CH_3$]
[11]	ОСТ 11.029.003—80	Вода деионизированная
[12]	ТУ 6-09-4292—76	Трис (оксиметил)аминометан [$NH_2C(CH_2OH)_3$]
[13]	ТУ 6-09-08-1024—81	2-меркаптоэтанол [C_2H_8OS]
[14]	ТУ 6-09-13-452—75	Этидий бромистый [$C_{21}H_{20}N_3Br$]
[15]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № B 4287	Альбумин бычий сывороточный сухой
[16]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 1806	Фермент Taq-полимераза
[17]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № P 2192	Буфер для ПЦР с $MgCl_2$
[18]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № A 6877	Агароза для электрофореза
[19]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № P 1473	ПЦР маркер 100 п. н.
[20]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 53198	Стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)
[21]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 44386	Стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5)
[22]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 4788	2′-дезоксиаденозин-5′трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (АТФ)
[23]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 4913	2′-дезоксицитидин-5′трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ)
[24]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 5038	2′-дезоксигуанозин-5′трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ГТФ)
[25]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № T 9656	2′-дезокситимидин-5′трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ТТФ)
[26]	ЗАО «Синтол» Россия (http://gost.e-ecolog.ru	Праймеры на промотор *35S*: *35S*-1 5′GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3′; *35S*-2 5′GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3′
[27]	ЗАО «Синтол» Россия (gost.e-ecolog.ru	Праймеры на терминатор NOS: *nos*-1 5′GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3′; *nos*-2 5′TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3′

УДК 663/664.001.4:006.354

ОКС 65.140
65.160
67.060
67.080
67.100
67.120
67.140
67.140.30
67.160.20
67.180.20
67.200.20
67.220
67.230

Ключевые слова: пищевое сырье, продукты пищевые, генетически модифицированные источники, идентификация, метод полимеразной цепной реакции, рекомбинантная ДНК, праймер для промотора, праймер для терминатора

Редактор переиздания *Е.И. Мосур*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.Р. Ароян*
Компьютерная верстка *Г.В. Струковой*

Сдано в набор 20.07.2020. Подписано в печать 24.11.2020. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

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 stinfo.ru

gost.e-ecolog.ru