МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 30812— 2021

ПРОДУКЦИЯ РЫБНАЯ ПИЩЕВАЯ

Методы идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2021

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 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО») и Волжско-Каспийским филиалом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» [Волжско-Каспийский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («КаспНИРХ»)]

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 сентября 2021 г. № 143-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
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 26
2021 . 1613- 30812—2021
1 2022 .

5 ВЗАМЕН ГОСТ 30812—2002

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 инфор- мация также будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты».

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2021

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Морфологический метод идентификации 4
4.1 Сущность метода 4
4.2 Общие требования и требования безопасности 4
4.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы 4
4.4 Порядок подготовки к проведению испытаний 5
4.5 Проведение идентификации 6
4.6 Обработка и оформление результатов идентификации 7
5 Молекулярно-генетический метод идентификации 7
5.1 Сущность метода 7
5.2 Общие требования и требования безопасности 7
5.3 Требования к условиям проведения испытаний 7
5.4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы 8
5.5 Порядок подготовки к проведению испытаний 10
5.6 Проведение идентификации 11
5.7 Обработка и оформление результатов идентификации 13
5.8 Контроль качества испытаний 13
Приложение А (справочное) Видовой состав рыб семейств Осетровые и Веслоносые с идентификационными кодами биологических видов 15
Приложение Б (справочное) Морфологические признаки идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые 16
Приложение В (справочное) Внешнее и внутреннее строения икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые 18
Приложение Г (справочное) Форма протокола идентификации образцов морфологическим методом 21
Приложение Д (справочное) Пример результатов секвенирования мтДНК 22
Приложение Е (справочное) Форма протокола идентификации образцов молекулярно-генетическим методом 23
Библиография 24

Поправка к ГОСТ 30812—2021 Продукция рыбная пищевая. Методы идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

Дата введения — 2021—11—12

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Таблица согласования	—	Азербайджан | AZ | Азстандарт

(ИУС № 3 2022 г.)

Поправка к ГОСТ 30812—2021 Продукция рыбная пищевая. Методы идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 8 2022 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКЦИЯ РЫБНАЯ ПИЩЕВАЯ

Методы идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

Food fish products. Methods for identification of sturgeons and paddlefish caviar

Дата введения — 2022—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевую рыбную продукцию и устанавливает морфологический и молекулярно-генетический методы идентификации икры рыб семейств Осетровые (*Acipenseridae*) и Веслоносые (*Polyodontidae*).

Морфологический метод, представленный в настоящем стандарте, позволяет установить принадлежность исследуемого образца к рыбам семейств Осетровые и Веслоносые.

Молекулярно-генетический метод, изложенный в настоящем стандарте, позволяет установить видовую принадлежность исследуемого образца, наследуемую по материнской линии. Метод не позволяет сделать вывод о возможном гибридном происхождении исследуемого образца.

Примечание — Молекулярно-генетический метод может быть применим для идентификации иных тканей, клеток и частей тела рыб семейств Осетровые и Веслоносые.

Настоящий стандарт не распространяется на многокомпонентную пищевую рыбную продукцию.

Видовой состав и идентификационные коды биологических видов рыб семейств Осетровые и Веслоносые приведены в приложении А.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные 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 12.1.030 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Защитное заземление, зануление

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

ГОСТ 61 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1625 Формалин технический. Технические условия

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

Издание официальное

ГОСТ 2874 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 3145 Часы механические с сигнальным устройством. Общие технические условия

ГОСТ 4530 Реактивы. Кальций углекислый. Технические условия

ГОСТ 5962 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 6419 Реактивы. Магний углекислый основной водный. Технические условия

ГОСТ 6709* Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 12738 Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 19126 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

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

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

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

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 28498 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 31339 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 34037 Упаковка стеклянная для химических реактивов и особо чистых химических веществ. Общие технические условия

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание — При использовании настоящего стандарта целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов в сети Интернет на официальном сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru з указателях национальных стандартов, издаваемых 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 [1], [2], а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **амплификация дезоксирибонуклеиновой кислоты** (амплификация ДНК) [amplification of deoxyribonucleic acid (DNA)]: Многократное увеличение числа молекул ДНК — копий матричной ДНК.

3.2 **анализируемая проба** (analyzed sample): Проба, подготовленная для анализа, все количество которой будет использовано для экстракции ДНК за один раз.

3.3 **база данных** (database): Компьютерная информационная система хранения генетической информации биологических объектов.

Примечание — В настоящем стандарте под базами данных подразумеваются электронные базы данных (например, GenBank, gost.e-ecolog.ru), доступные через интернет-ресурс, содержащие охарактеризованные последовательности нуклеиновых кислот организмов различных видов и доступные пользователям на безвозмездной основе.

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

3.4 **идентификация икры рыб** (identification of fish caviar): Процедура определения принадлежности рассматриваемой пищевой рыбной продукции к икре рыб семейств Осетровые и Веслоносые на основании изучения комплекса их морфологических и генетических признаков.

3.5 **контрольный регион митохондриальной ДНК** (контрольный регион мтДНК) (mtDNA control region): Вариабельный некодирующий участок мтДНК осетровых и веслоносых рыб, содержащий сайт инициации репликации.

3.6 **мастермикс** (mastermix): Готовая специфичная смесь реагентов, необходимых для амплификации ДНК, включающая в себя ДНК-полимеразу, буфер и другие компоненты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Примечание — Специфичность ПЦР зависит от того, какие праймеры и матрица будут добавлены в эту смесь.

3.7 **микро́пиле** (micropyle): Отверстие в оболочках икры рыб, служащее для проникновения сперматозоида внутрь икринки.

3.8 **митохондриальная ДНК;** мтДНК (mitochondrial DNA (mtDNA): Кольцевая двунитиевая молекула ДНК, заключающая в себе митохондриальный геном и входящая в состав митохондрий.

3.9 **овулировавшая икра рыб** (ovulated fish eggs): Икринки, свободно отделяющиеся от соединительной ткани ястыков в процессе нереста или искусственной стимуляции рыбы.

3.10 **отжиг праймера** (primer annealing): Гибридизация праймера с комплементарной последовательностью матричной ДНК в процессе ПЦР при заданных условиях.

3.11 **отрицательный контрольный образец;** ОКО: (negative control sample): Раствор, используемый вместо анализируемой пробы для контроля выделения ДНК.

3.12 **отрицательный контроль ПЦР (К–)** [PCR negative control (K–)]: Реакционная смесь для проведения ПЦР с использованием специфичных праймеров, заведомо не содержащая целевую матричную ДНК.

3.13 **отрицательный контроль чистоты выделения ДНК (Кв)** (DNA isolation negative control): Контрольный образец, прошедший все этапы выделения ДНК, но в отсутствии анализируемой пробы.

3.14 **положительный контроль ПЦР (К+)** (positive PCR control (K+): Реакционная смесь для проведения ПЦР с использованием специфичных праймеров, заведомо содержащая целевую матричную ДНК.

3.15 **пара нуклеотидов (п.н.)** [base pair (b.p.)]: Структурная единица двуцепочечной молекулы ДНК, содержащая пару комплиментарных нуклеиновых оснований, соединенных водородными связями и находящихся в составе противоположно направленных комплиментарных цепочек ДНК.

Примечание — Единица измерения длины молекулы ДНК.

3.16 **полимеразная цепная реакция;** ПЦР (polymerase chain reaction (PCR): Ферментативная циклическая реакция, являющаяся амплификацией матричной молекулы ДНК в буферном растворе, осуществляемая в амплификаторе (термоциклере) *in vitro*, с использованием матричной ДНК, праймеров, смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и термостабильной ДНК-полимеразы, результатом которой является экспоненциальное накопление ПЦР-продукта.

3.17 **последовательность нуклеотидов** (nucleotide sequence): Порядок чередования нуклеиновых оснований в нуклеиновой кислоте.

3.18 **праймер** (primer): Короткий (как правило, от 15 до 30 нуклеотидов) искусственно синтезированный одноцепочечный фрагмент ДНК (олигонуклеотид) с определенной длиной и последовательностью нуклеотидов, комплементарной 5′-концу одной из цепей амплифицируемой матричной ДНК.

Примечание — Применяется для обозначения границ фрагмента ДНК, подлежащего амплификации при получении ПЦР-продукта, а также при секвенировании для начала синтеза цепи ДНК.

3.19 **ПЦР-продукт** (PCR product): Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР.

3.20 **секвенирование ДНК** (DNA sequencing): Определение последовательности нуклеотидов фрагмента молекулы ДНК.

3.21 **смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов** (смесь дНТФ) (dNTPs mixture): Раствор, содержащий смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов — азотистых оснований [аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т), цитозин (Ц)], необходимых для синтеза новых цепей ДНК, комплементарных матричной ДНК.

3.22 **смесь дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов** (смесь ддНТФ) (ddNTPs mixture): Смесь производных дНТФ, у которых гидроксильная группа 3′ атома углерода дезоксирибозы замещена атомом водорода.

Примечание — Флуоресцентно-меченные ддНТФ используют в реакции секвенирования ДНК по Сэнгеру в качестве терминаторов элонгации праймеров, так как их включение прерывает возможность дальнейшего удлинения цепи ДНК.

3.23 **экстракция ДНК** (DNA extraction): Процедура выделения, очистки и получения водного препарата ДНК вследствие высвобождения ДНК из лизируемых тканей анализируемой пробы.

3.24 **элонгация праймера** (primer elongation): Реакция, катализируемая ДНК-полимеразой, приводящая к синтезу новой цепи ДНК путем добавления одиночных дезоксирибонуклеотидов к 3′-концу праймера.

4 Морфологический метод идентификации

4.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в установлении принадлежности пищевой рыбной продукции к икре рыб семейств Осетровые и Веслоносые по морфологическим макро- и микроструктурным признакам, приведенным в приложениях Б и В.

4.2 Общие требования и требования безопасности

4.2.1 Общие требования, предъявляемые к компетентности испытательной лаборатории, проведению испытаний и персоналу, — по ГОСТ ISO/IEC 17025.

4.2.2 При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать общие требования безопасности обращения с вредными веществами по ГОСТ 21.1.007.

4.2.3 Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны — по ГОСТ 12.1.005.

4.2.4 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и должно быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.2.5 При работе с электроприборами следует соблюдать требования по ГОСТ 12.1.030.

4.2.6 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха — от 15 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха — от 20 % до 80 %.

4.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

4.3.1 Для проведения испытаний применяют следующие средства измерений и вспомогательное оборудование:

- весы неавтоматического действия специального класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 или весы по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- стереомикроскоп по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- термометр жидкостный стеклянный с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 28498;
- электроплитку бытовую по ГОСТ 14919;
- часы механические по ГОСТ 3145.

4.3.2 Для проведения испытаний применяют следующие реактивы:

- воду дистиллированную по ГОСТ 6709 или по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- воду питьевую по ГОСТ 2874 или по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- кальций углекислый ч. д. а по ГОСТ 4530;
- кислоту уксусную ледяную по ГОСТ 61;
- магний углекислый ч. д. а по ГОСТ 6419;
- кислоту пикриновую х. ч. по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;
- формалин технический по ГОСТ 1625.

4.3.3 Для проведения испытаний применяют следующие посуду и материалы:

- банку стеклянную с притертой крышкой вместимостью 500 $см^3$ по ГОСТ 34037;
- бумагу фильтровальную лабораторную по ГОСТ 12026;
- иглы препаровальные по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;

- капельницу стеклянную по ГОСТ 25336;
- кисть художественную мягкую № 1 по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 1000 $см^3$ по ГОСТ 12738;
- лезвия безопасной бритвы по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- пинцеты медицинские по ГОСТ 21241;
- скальпель медицинский по ГОСТ 21240;
- сосуды стеклянные прямоугольные вместимостью 1500 $см^3$ по ГОСТ 25336;
- стаканы стеклянные В-1—100 ТХС, В-1—500 ТХС по ГОСТ 25336;
- стекло предметное по ГОСТ 9284;
- цилиндры мерные стеклянные вместимостью 50; 100; 300; 500; 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770;
- шпатели металлические по ГОСТ 19126.

4.3.4 Допускается использование других средств измерений и вспомогательного оборудования с аналогичными или более совершенными метрологическими и техническими характеристиками, а также реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

4.4 Порядок подготовки к проведению испытаний

4.4.1 Приготовление растворов

4.4.1.1 Приготовление 10 %-ного нейтрального раствора формалина

В сосуд вместимостью 1500 $см^3$ вносят (100,0 ± 0,1) г карбоната кальция или магния, добавляют 1000 $см^3$ 40 %-ного раствора формалина, перемешивают и оставляют на сутки. Полученный раствор разбавляют водой в соотношении 1:9.

Срок хранения 10 %-ного нейтрального раствора формалина — 3 мес со дня изготовления.

4.4.1.2 Приготовление смеси Буэна

В мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят (3,0 ± 0,1) г кристаллической пикриновой кислоты, доводят до метки горячей дистиллированной водой и перемешивают. В банку с притертой крышкой переносят 300 $см^3$ полученного раствора пикриновой кислоты, добавляют 100 $см^3$ 10 %-ного нейтрального раствора формалина по 4.4.1.1 и перемешивают. В смесь аккуратно добавляют 20 $см^3$ ледяной уксусной кислоты и осторожно перемешивают.

Смесь Буэна готовят непосредственно перед началом работ.

4.4.2 Отбор проб

Отбор, хранение и регистрация проб — по ГОСТ 31339 или в соответствии с нормативными документами на данный вид пищевой рыбной продукции.

4.4.2.1 Отбор точечных проб

Из разных мест каждой вскрытой единицы транспортной упаковки с пищевой рыбной продукцией отбирают точечные пробы в соответствии с ГОСТ 31339.

4.4.2.2 Выделение средней пробы

Масса средней пробы должна быть от 5 до 10 г.

4.4.2.3 Для икры-сырца, зернистой икры отбирают точечные пробы (икринки) из различных мест каждой отобранной упаковки, из которых составляют среднюю пробу.

4.4.2.4 Для паюсной, ястычной икры отбирают точечные пробы (в виде кубика со стороной не более 1 см) из различных мест каждой отобранной упаковки, из которых составляют среднюю пробу.

4.4.2.5 Отбор проб проводят с помощью скальпелей, пинцетов или шпателей.

4.4.2.6 При направлении проб для идентификации в лабораторию (центр) или в случае разногласий часть средней пробы помещают в стеклянную банку и заливают водным раствором 10 %-ного нейтрального формалина или смесью Буэна. Объемное соотношение пробы икры и водного раствора 10 %-ного нейтрального формалина или смеси Буэна должно быть не менее 1:10. Банку с пробой укупоривают, а при необходимости опечатывают или опломбировывают.

4.4.2.7 Проба в растворе формалина или смеси Буэна может храниться в лаборатории (центре) при комнатной температуре в течение нескольких лет.

4.4.3 Подготовка пробы для идентификации

4.4.3.1 Часть отобранной пробы по 4.4.2 в виде отдельных икринок или нескольких соединенных икринок помещают в стакан с кипящей питьевой или дистиллированной водой. Кипятят пробу от 1,5 до 2,5 мин. В результате кипячения белковая жидкость внутри икринок коагулирует, после чего они легко разрезаются.

4.4.3.2 При фиксировании пробы в водном растворе 10 %-ного нейтрального формалина кипячение не проводят. Объемное соотношение пробы икры и раствора формалина должно быть не менее 1:10. Из емкости с пробой сливают раствор формалина и промывают пробу икры большим объемом питьевой или дистиллированной воды.

4.4.3.3 При фиксировании пробы икры в смеси Буэна кипячение не проводят. Из емкости с пробой сливают смесь Буэна и промывают пробу икры в этиловом спирте, а затем большим объемом питьевой или дистиллированной воды.

4.4.3.4 После кипячения или промывания пробы икры от раствора формалина или смеси Буэна икринки разрезают скальпелем или лезвием безопасной бритвы по анимально-вегетативной оси. При невозможности определения расположения полюсов икринки разрезают на две половины в любом направлении.

4.4.3.5 Пробы паюсной, ястычной икры рассекают таким образом, чтобы получить тонкий срез-пластинку.

4.4.3.6 При определении каналов микро́пиле у икринки находят анимальный полюс. Для удаления фолликулярной и соединительно-тканной оболочек поверхность икринки у анимального полюса осторожно протирают кистью. Отделяют верхнюю часть анимальной области таким образом, чтобы анимальный полюс был посередине. В срезанную часть икринки между оболочкой и цитоплазмой вводят препаровальную иглу и, проводя иглой по окружности, полностью отделяют цитоплазму от оболочки.

4.4.3.7 Подготовленные срезы или оболочки помещают на предметное стекло (оболочки — внутренней стороной вверх) и рассматривают их под стереомикроскопом в капле воды.

4.5 Проведение идентификации

4.5.1 Выявление макроструктурных признаков

Пробу, отобранную по 4.4.2 и подготовленную по 4.4.3, рассматривают под стереомикроскопом при увеличении от 10$^{\times}$ до 30$^{\times}$ в отраженном свете.

По макроструктурным морфологическим признакам икра рыб семейств Осетровые и Веслоносые должна соответствовать характеристикам, приведенным в таблице Б.1 (приложение Б) и приложении В:

- признаки неоднородности окраски икринки у анимального и вегетативного полюсов (вокруг анимального полюса может располагаться одно или несколько чередующихся темных и светлых колец, анимальная часть более светлая по сравнению с вегетативной, у отдельных икринок наблюдают светлое полярное пятно в центре анимального полюса) представлены на рисунках В.1 и В.2 (приложение В);
- внешний вид непрозрачных икринок как у икры, содержащей пигмент меланин, так и непигментированной (из ястыков III стадии зрелости гонад или от рыб-альбиносов) приведен на рисунке В.2 (приложение В);
- внешний вид мраморoподобной окраски икринок проиллюстрирован на рисунке В.3 (приложение В).

4.5.2 Выявление микроструктурных признаков

Пробу, отобранную по 4.4.2 и подготовленную по 4.4.3, рассматривают под стереомикроскопом при увеличении от 10$^{\times}$ до 30$^{\times}$ в отраженном свете.

Принадлежность исследуемого объекта к икре рыб семейств Осетровые и Веслоносые выявляют по следующим микроструктурным признакам внутреннего строения, приведенным в таблице Б.2 (приложение Б) и приложении В:

- по наличию непрозрачной светлоокрашенной цитоплазмы, имеющей гомогенную мелкозернистую структуру; потемнению цитоплазмы в отдельных образцах икры-зерна, готовой продукции; смещению пигмента или границы пигментного слоя в глубь цитоплазмы (вызывает эффект мраморoподобной окраски икринки); инфильтрации жидкости под оболочку; образованию крупных жировых капель. Графические изображения приведены на рисунках В.2—В.5 (приложение В);
- наличию пигмента, расположенного под оболочкой в периферическом слое цитоплазмы в виде темного кольца; диффундированию пигмента в цитоплазму, разрывам или смещениям пигментного слоя от оболочки, которые наблюдаются в отдельных партиях икры-зерна при хранении или технологической обработке. Графические изображения приведены на рисунках В.4—В.7 (приложение В);
- наличию ядра округлой или веретенообразной формы (более темного образования по сравнению с цитоплазмой), преимущественно смещенного в сторону анимального полюса (степень смещения ядра зависит от стадии зрелости яичников). Графические изображения приведены на рисунках В.4 и В.7 (приложение В).

На поздних стадиях зрелости у овулировавшей икры ядро как морфологическая структура исчезает; при отдельных видах технологической обработки икры-зерна установить наличие ядра на срезе икринки не представляется возможным;

- наличию многослойной прозрачной (полупрозрачной) оболочки, состоящей из студенистого слоя, наружного и внутреннего, радиальных (желточных) слоев, а также по наличию многослойного строения оболочки, которая наблюдается при варьировании угла падения света на препарат. Графические изображения приведены на рисунках В.4—В.7 (приложение В);

- нарушению целостности оболочки, расслоения и набухания, образующихся при технологической обработке и хранении. Графические изображения приведены на рисунках В.5, В.6 (приложение В);

- наличию нескольких микро́пиле на анимальном полюсе икринки, которые четко различимы в икре-зерне и готовой продукции, изготовленной из икры рыб, и имеют поздние стадии зрелости ястыков (микро́пиле различимы в виде темных или преломляющих свет точек при рассматривании препарата в проходящем свете). Графические изображения приведены на рисунке В.7 (приложение В).

Наличие ядра и микро́пиле у икринок являются дополнительными признаками, характеризующими исследуемый объект как икру семейств Осетровые и Веслоносые. Наличие микро́пиле определяют в спорных случаях.

4.6 Обработка и оформление результатов идентификации

4.6.1 Результаты идентификации оценивают по каждой пробе отдельно и сопоставляют с характеристиками показателей, приведенными в приложениях Б, В.

4.6.2 Результаты идентификации оформляют протоколом по форме, приведенной в приложении Г.

5 Молекулярно-генетический метод идентификации

5.1 Сущность метода

Метод заключается в установлении нуклеотидной последовательности ДНК в анализируемом образце, которую записывают в виде последовательности букв, кодирующих четыре возможных азотистых основания ДНК (русск. — А, Т, Г, Ц; лат. — A, T, G, C). Для этого применяют метод секвенирования ДНК по Сэнгеру (с использованием флуоресцентно-меченных терминаторов реакции) продукта амплификации выбранного участка ДНК, полученного при помощи ПЦР. После получения продукта секвенирования ДНК проводят электрофоретическое разделение продуктов реакции секвенирования методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции с одновременной компьютерной записью четырехцветной электрофореграммы, с последующим преобразованием пиков флуоресценции продукта секвенирования ДНК в буквенный код, описывающий нуклеотидную последовательность в анализируемом участке ДНК исследуемого образца. После получения буквенного кода последовательности оснований ДНК данную последовательность сравнивают с известными аннотированными последовательностями, опубликованными в доступных базах данных с целью идентификации икры рыб.

Примечание — Планирование выполнения измерений рекомендуется проводить с учетом дополнительных процедур, изложенных в инструкциях, прилагаемых к наборам. Рекомендуется изучить эти инструкции перед планированием работ.

5.2 Общие требования и требования безопасности

5.2.1 Общие требования и требования безопасности — по 4.2.

5.2.2 К выполнению измерений и (или) обработке их результатов допускаются лица, имеющие соответствующее высшее специальное образование, прошедшие инструктаж, владеющие техникой постановки ПЦР и секвенирования ДНК, а также изучившие инструкции по эксплуатации применяемого оборудования и используемых наборов.

5.3 Требования к условиям проведения испытаний

5.3.1 Требования к условиям проведения испытаний — по 4.2.

5.3.2 Для испытаний, основанных на ПЦР, дополнительным требованием является наличие отдельных специализированных рабочих помещений с собственным оборудованием для исключения случайной контаминации ДНК:

а) рабочая зона для экстракции нуклеиновых кислот из анализируемого материала;

б) рабочая зона, предназначенная для постановки ПЦР;

в) рабочая зона, предназначенная для последующей обработки, включая анализ амплифицированных последовательностей ДНК.

5.4 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы, посуда и реактивы

5.4.1 При проведении испытаний вспомогательное оборудование следует обслуживать в соответствии с инструкциями производителя и требованиями ГОСТ ISO/IEC 17025. Для проведения испытаний применяют следующие средства измерений и оборудование:

- амплификатор с нагреваемой крышкой, позволяющей проводить ПЦР без использования минерального масла для микропробирок вместимостью 0,2 $см^3$ с возможностью активного регулирования температуры по раствору в пробирке[1)];
- анализатор генетический для разделения фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции, позволяющий осуществить прочтение нуклеотидной последовательности длиной не менее 750 нуклеотидов с точностью не менее 99 % с набором расходных материалов, необходимых для запуска прибора, согласно инструкции производителя[2)];
- бокс ламинарный с классом биологической безопасности II типа А для выделения ДНК;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- весы неавтоматического действия специального класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 или весы по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- видеосистему для регистрации и передачи изображения флуоресцирующей ДНК в электрофорезных гелях;
- дозаторы жидкостей медицинские лабораторные с варьируемым объемом доз по ГОСТ 28311;
- источник питания постоянного тока для электрофореза с диапазоном регулируемого выходного напряжения от 50 до 300 В;
- камеру для горизонтального электрофореза с аксессуарами для заливки агарозного геля;
- печь микроволновую (СВЧ) мощностью не менее 400 Вт по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- мини-центрифугу с роторами для микропробирок вместимостью 0,2; 0,6 и 1,5 $см^3$ со скоростью вращения не менее 2400 об/мин;
- микроколонки для обессоливания типа Centri-Sep[3)] ;
- термостат твердотельный с диапазоном температур от 25 °С до 100 °С для микропробирок вместимостью 1,5 $см^3$;
- холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678, с холодильной камерой, обеспечивающей поддержание температуры от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше минус 18 °С;
- центрифугу с угловым ротором для микропробирок вместимостью 1,5 $см^3$ с максимальной скоростью вращения не менее 13 000 об/мин.

5.4.2 Для проведения испытаний применяют следующие реактивы:

- агарозу для электрофоретического разделения ДНК;
- воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
- воду для молекулярной биологии, свободную от нуклеаз дистиллированную ультрачистую или деионизованную[4)];
- маркер молекулярных масс ДНК, содержащий фрагменты ДНК размером от 100 до 1000 п.н. концентрацией 100 $нг/мм^3$;

[1)] Примером подходящего оборудования может служить амплификатор «T100» (Bio-RAD, США), здесь и далее информация, приведенная в сноске, не носит рекламный характер и приведена для удобства пользования стандартом.

[2)] Примером подходящего оборудования могут служить: а) генетический анализатор «Нанофор-05» (Институт аналитического приборостроения РАН, РФ) с капиллярным блоком 50 см; б) генетический анализатор «AB3500» (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific, США).

Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

[3)] Примером могут служить колонки «Centri-Sep» (Princeton Separations, США).

[4)] Примером подходящего реактива могут служить: а) вода деионизованная, свободная от нуклеаз (Евроген, РФ); б) «Ambion® DEPC-treated water» (Thermo Scientific, США); в) «UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water» (Invitrogen, США).

- набор для выделения геномной ДНК из различных тканей[1)].

Примечание — В настоящем стандарте допускается использование любого из выбранных методов выделения ДНК. Методы выделения ДНК с использованием сорбента и колонок с силиконовой мембраной рассматривают как равнозначные и взаимозаменяемые;

- набор для ПЦР. Содержащий Taq-полимеразу, 10-кратный реакционный ПЦР-буфер, раствор магния хлорида концентрацией 50 ммоль/дм^3, смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов концентрацией 2,5 ммоль/дм^3 каждый, инструкцию по использованию набора для постановки ПЦР[2)].

Примечание — В настоящем стандарте допускается использование готовых 2,5- и 5-кратных мастер-миксов для ПЦР. Для улучшения специфичности амплификации рекомендуется использовать полимеразу, инактивированную антителами. Активация фермента происходит в течение первого шага программы амплификации — предварительной денатурации;

- набор для секвенирования ДНК по Сэнгеру, содержащий реагент — смесь флуоресцентно-меченных ддНТФ — терминаторов элонгации праймера [3)];

- праймер для постановки ПЦР «tPro2» нуклеотидной последовательностью: 5′—ACCCTTAACTCCCAAAGC—3′ лиофилизированный или водный раствор концентрацией 10 мкмоль/дм^3 и чистотой олигонуклеотида не менее 95 %;

- праймер для постановки ПЦР «HN20» нуклеотидной последовательностью: 5′—GTGTTATGCTTTAGTTAAGC—3′ лиофилизированный или водный раствор концентрацией 10 мкмоль/дм^3 и чистотой олигонуклеотида не менее 95 %;

- полимер для капиллярного электрофореза[4)];

- спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962;

- трис-ацетат-ЭДТА электродный буфер для горизонтального электрофореза в агарозном геле (50-кратный концентрированный буферный раствор ТАЕ), свободный от нуклеаз[5)];

- формамид высокоочищенный, деионизированный для денатурации нуклеиновых кислот перед капиллярным электрофорезом[6)];

- буфер электродный для капиллярного электрофореза (10-кратный концентрированный буферный раствор)[7)];

- этидия бромид, водный раствор концентрацией 10 г/дм^3 по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

5.4.3 Для проведения испытаний применяют следующие посуду и материалы:

- колбы мерные ТХС 500; 1000; 2000 см^3 по ГОСТ 1770;

- наконечники с фильтром для дозаторов с варьируемыми объемами доз: 10; 200; 1000 мм^3;

- перчатки одноразовые лабораторные из латекса без пудры по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;

- пинцет медицинский по ГОСТ 21241;

---

1) Примером могут служить такие наборы, как: а) «К-Сорб» (СИНТОЛ, РФ); б) «ExtractDNA Blood» (Евроген, РФ); в) «DNeasy Blood & Tissue Kit» (Qiagen, Нидерланды); г) «Wizard® SV Genomic DNA Purification System» (Promega Corp., США); д) «NucleoSpin Tissue» (Macherey Nagel, Германия).

2) Примером могут служить наборы: а) «ПЦР-Комплект» (СИНТОЛ, РФ); б) «ScreenMix» (Евроген, РФ); в) Мастермиксы серии «5х Master Mix» (Диалат, РФ).

Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

3) Примером подходящего набора для секвенирования по Сэнгеру могут служить наборы: а) «BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific, США); б) «BrilliantDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit» (Nimagen, Нидерланды).

4) Примером подходящего реактива могут служить: а) «ПДМА-6» (СИНТОЛ, РФ); б) «NimaPOP-6», «NimaPOP-7» (Nimagen, Нидерланды); в) «POP-7» (Applied Biosystems/ThermoFisher Scientific, США).

5) Примером подходящего реактива может служить «50X ТАЕ электродный буфер» (Евроген, РФ).

6) Примером подходящего реактива может служить: а) «Hi-Di™ Formamide» (Applied Biosystems, США); б) «Seq-DI Formamide v2» (Nimagen, Нидерланды).

7) Примером подходящего реактива могут служить: а) «ТАПС буфер 10Х» (СИНТОЛ, РФ); б) «A.C.E.™ sequencing buffer, 10X, concentrate» (VWR Chemicals, Австрия); в) «NimaPOP 10X Running Buffer (with EDTA)» (Nimagen, Нидерланды). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

- планшеты 96-луночные для автоматического генетического анализатора с уплотнителем, основанием (штативом) и фиксатором;

- пробирки для ПЦР вместимостью 0,2 $см^3$;

- пробирки мини-центрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 $см^3$;

- пробирки полипропиленовые с завинчивающейся крышкой типа Фалькон вместимостью 50 $см^3$;

- салфетки бумажные одноразовые по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;

- стаканы стеклянные В-1—100 ТХС, В-1—250 ТХС, В-1—500 ТХС по ГОСТ 25336;

- цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25; 50; 100; 250; 500; 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770;

- шпатель металлический по ГОСТ 19126;

- штативы под микропробирки вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 $см^3$ по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;

- штативы-контейнеры для хранения образцов в пробирках вместимостью 1,5 $см^3$.

5.4.4 Допускается использование других средств измерений и вспомогательного оборудования с аналогичными или более совершенными метрологическими и техническими характеристиками, а также посуды, реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

5.4.5 Способы выделения ДНК с использованием сорбента и колонок с силиконовой мембраной рассматривают как равнозначные и взаимозаменяемые.

Примечание — Рекомендуется использовать проверенные и сертифицированные реактивы. Все наборы должны иметь в составе инструкции, с которыми необходимо внимательно ознакомиться перед началом работ.

5.5 Порядок подготовки к проведению испытаний

5.5.1 Приготовление реактивов

5.5.1.1 Приготовление 1-кратного электродного буфера ТАЕ

В зависимости от необходимого объема 1-кратного электродного буфера ТАЕ для заполнения электрофорезной камеры и приготовления агарозы применяют один из нижеприведенных вариантов:

- в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ добавляют 10 $см^3$ 50-кратного концентрированного буферного раствора ТАЕ и доводят объем полученного раствора до 500 $см^3$ дистиллированной водой, затем перемешивают;

- в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ добавляют 20 $см^3$ 50-кратного концентрированного буферного раствора ТАЕ и доводят объем полученного раствора до 1000 $см^3$ дистиллированной водой, затем перемешивают;

- в мерную колбу вместимостью 2000 $см^3$ добавляют 40 $см^3$ 50-кратного концентрированного буферного раствора ТАЕ и доводят объем полученного раствора до 2000 $см^3$ дистиллированной водой, затем перемешивают.

Срок хранения 1-кратного электродного буфера ТАЕ составляет 6 мес при комнатной температуре.

5.5.1.2 Приготовление агарозного геля

В посуду из термостойкого стекла вместимостью 500 $см^3$ вносят 3,6 г агарозы, добавляют 200 $см^3$ 1-кратного электродного буфера ТАЕ. Полученную суспензию агарозы в той же посуде доводят до кипения в СВЧ-печи (при средней мощности нагрева), периодически помешивая и не допуская бурного кипения, продолжают нагревать до абсолютно прозрачного состояния.

Агарозу охлаждают до температуры от 50 °С до 60 °С, добавляют 5 $мм^3$ раствора этидия бромида и аккуратно перемешивают. Далее выдерживают в термостате при температуре 55 °С не менее 15 мин.

5.5.1.3 Приготовление реакционной смеси для ПЦР

В пробирку вместимостью 0,2 $см^3$ вносят 1 $мм^3$ праймера «tPro2» концентрацией 10 мкмоль/$дм^3$, 1 $мм^3$ праймера «HN20» концентрацией 10 мкмоль/$дм^3$, добавляют реактивы из набора для ПЦР: 2,5 $мм^3$ 10-кратного ПЦР-буфера; 1 $мм^3$ раствора $MgCl_2$ концентрацией 50 ммоль/$дм^3$; 1 $мм^3$ смеси дНТФ концентрацией 2,5 моль/$дм^3$; 0,5 $мм^3$ Taq-полимеразы концентрацией 5 ед/$мм^3$; добавляют 17 $мм^3$ деионизованной воды для молекулярной биологии и перемешивают.

5.5.1.4 Приготовление реакционной смеси для секвенирования ПЦР-продукта

В пробирку вместимостью 0,2 $см^3$ вносят 0,8 $мм^3$ праймера «HN20» концентрацией 10 мкмоль/$дм^3$, добавляют 2 $мм^3$ реагента для секвенирования, 1 $мм^3$ 5-кратного буфера из набора для секвенирования по Сэнгеру добавляют 2,2 $мм^3$ деионизованной воды для молекулярной биологии и перемешивают.

5.5.2 Отбор проб

5.5.2.1 Пробы отбирают и регистрируют по 4.4.2.

5.5.2.2 В том случае, если процесс лизиса анализируемой пробы с последующим выделением ДНК будет начат не ранее чем через 1 ч от момента отбора проб, пробу в количестве от 2 до 3 г помещают в отдельную пробирку вместимостью 50 $см^3$ и фиксируют десятикратным объемом 96 %-ного раствора этилового спирта. Объемное соотношение пробы и раствора этилового спирта для сохранения ДНК должно быть не менее 1:10.

Пробы хранят в растворе этилового спирта при комнатной температуре не более 30 сут, в морозильной камере при температуре не выше минус 16 °С не более 36 мес.

5.5.2.3 На всех этапах отбора проб должны быть обеспечены условия, предотвращающие контаминацию, изменение состава и состояния отобранных проб. Пробы могут быть доставлены в лабораторию в мороженом виде после фиксации раствором этилового спирта концентрацией 96 % объемом, не менее чем в пять раз превышающем объем фиксируемой пробы.

5.5.2.4 Не допускается попадание смеси Буэна или формальдегида в емкость с раствором этилового спирта для фиксации пробы, направляемой на молекулярно-генетический анализ. Пробы, вступившие в соприкосновение со смесью Буэна или формальдегида, считаются непригодными для молекулярно-генетического анализа.

5.5.3 Выделение ДНК

Для целей видовой идентификации зернистой икры используют интактную икринку. В случае исследования паюсной и ястычной икры объем отбираемых икринок увеличивают в два-три раза.

5.5.3.1 Для выделения ДНК из образца отбирают пробу массой (объемом), рекомендованной(ым) в инструкции, прилагаемой к набору для выделения ДНК. Если материала достаточно, рекомендуется параллельно подготовить два образца. Перед выделением ДНК необходимо удалить фиксирующий раствор (спирт может быть удален фильтровальной бумагой или салфеткой).

5.5.3.2 Анализируемую пробу помещают в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 $см^3$ и добавляют буфер для лизиса из набора для выделения геномной ДНК. Пробирку помещают в термостат для инкубации при температуре и на срок, указанные в инструкции к примененному набору для экстракции и очистки ДНК.

5.5.3.3 Дальнейшие этапы выделения ДНК из анализируемой пробы проводят согласно инструкции к примененному набору для выделения ДНК.

5.5.3.4 Фильтрат, колонки и пробирки, подлежащие удалению, помещают в контейнеры для сброса наконечников и использованных пробирок, герметично закрывают и утилизируют.

5.5.3.5 Выделенный препарат ДНК используют для постановки ПЦР.

Допускается хранение препарата ДНК при температуре от 2 °С до 8 °С сроком не более 2 нед или при температуре не выше минус 18 °С в течение 12 мес.

5.6 Проведение идентификации

5.6.1 Амплификация контрольного региона мтДНК

5.6.1.1 В пробирку для ПЦР вместимостью 0,2 $см^3$ в качестве матрицы для амплификации ДНК вносят 1 $мм^3$ препарата по 5.5.3. Добавляют 24 $мм^3$ реакционной смеси для ПЦР по 5.5.1.3.

5.6.1.2 Аналогичным способом готовят пробирки для ПЦР с Кв, К+ и К–.

5.6.1.3 Пробирки со смесью по 5.6.1.1 и 5.6.1.2 помещают в амплификатор с нагреваемой крышкой (температура крышки — 110 °С постоянно).

ПЦР проводят по следующей схеме:

а) предварительная денатурация ДНК — при температуре 95 °С в течение 2 мин;

б) синтез ПЦР-продуктов (35 циклов):

1) денатурация ДНК — при температуре 95 °С в течение 10 с,

2) отжиг праймеров — при температуре 54 °С в течение 30 с,

3) синтез цепи ДНК — при температуре 72 °С в течение 60 с;

в) окончательная достройка цепей — при температуре 72 °С в течение 5 мин;

г) охлаждение — при температуре 12 °С постоянно.

Примечание — Допускается хранение ПЦР-продукта в закрытой микропробирке при температуре от 2 °С до 8 °С сроком не более 2 нед или при температуре не выше минус 18 °С в течение более длительного срока.

5.6.1.4 Результат амплификации проверяют методом электрофореза в агарозном геле, приготовленном по 5.5.1.2.

5.6.2 Детекция ПЦР-продукта

5.6.2.1 Камеру для электрофореза размещают на столе, устанавливают в строго горизонтальном положении и производят заливку агарозного геля с последующим заполнением камеры 1-кратным электродным буфером ТАЕ по 5.5.1.1 согласно инструкции по использованию камеры для горизонтального электрофореза.

5.6.2.2 В камеру для электрофореза заливают готовый 1-кратный электродный буфер ТАЕ по 5.5.1.1 таким образом, чтобы жидкость покрывала гелевую пластинку.

5.6.2.3 Из пробирки с продуктом амплификации по 5.6.1 отбирают дозатором 5 мм^3 анализируемой пробы, смешивают с 2 мм^3 буфера для нанесения (концентрированная краска, которая входит в набор с маркером молекулярных масс ДНК) и вносят в лунки агарозного геля, покрытые 1-кратным электродным буфером. Для каждого отдельного образца используют отдельную лунку. В отдельную свободную лунку в ряду лунок с образцами обязательно должен быть нанесен маркер молекулярных масс ДНК.

5.6.2.4 Камеру подключают к источнику тока, соблюдая полярность. Электрофорез проводят при напряжении и в течение определенного времени согласно рекомендациям в инструкции к использованию камеры для горизонтального электрофореза.

5.6.2.5 По завершении электрофореза выключают источник тока, переносят гель на экран включенного трансиллюминатора. Получают изображение агарозного геля с помощью видеосистемы регистрации и передачи изображения флуоресцирующей ДНК в электрофорезных гелях.

5.6.3 Учет результатов ПЦР

5.6.3.1 На электрофореграмме качественно (визуально) определяют наличие или отсутствие специфической полосы амплифицированной ДНК размером около 1000 п.н. Точная длина амплифицированного специфического фрагмента ДНК зависит от вида объекта испытаний и может варьироваться в пределах нескольких десятков нуклеотидов. При этом не должно наблюдаться дополнительных полос, за исключением возможных димеров праймеров, находящихся ниже уровня 100 п.н.

5.6.3.2 Если результаты анализа положительных и отрицательных контролей не соответствуют 5.6.3.1, испытание повторяют начиная со следующих этапов:

- если в дорожках Кв и/или К– выявляется специфическая полоса, следовательно произошла контаминация реактивов или проб. Принимают меры по выявлению источника контаминации. Повторяют испытание с этапа выделения ДНК (5.5.3);

- если в дорожке К+ не выявляется специфическая полоса, повторяют испытание с этапа амплификации ДНК (5.6.1);

- если в дорожках наблюдаются неспецифические полосы на разных уровнях, то испытание повторяют с этапа ПЦР. Возможная причина неспецифической амплификации — неверный температурный режим в ячейках амплификатора;

- если после повторной амплификации ДНК результаты ПЦР не соответствуют 5.6.3.1, испытание повторяют начиная с этапа 5.5.3, заменяя все реактивы на новые. Возможная причина неудовлетворительного результата — ухудшение свойств исходных компонентов реактивов.

5.6.3.3 Если результаты амплификации контролей не противоречат ожидаемому результату, переходят к дальнейшим испытаниям.

5.6.3.4 В том случае, если после повторной амплификации отсутствует полоса в анализируемом образце, но присутствует в К+ (положительным контрольным образце), образец признают непригодным для дальнейшего анализа. Возможная причина неудовлетворительного результата — фатальное разрушение (деградация) мтДНК вследствие неудовлетворительных условий хранения (фиксации) образца.

5.6.4 Реакция секвенирования продукта амплификации

5.6.4.1 Перед секвенированием амплифицированного фрагмента ДНК проводят очистку ПЦР-продукта от невключившихся компонентов реакции.

В предварительно подготовленную колонку типа Centri-Sep наносят образец, полученный по 5.6.1 в полном количестве, после чего центрифугируют при рекомендованной скорости.

5.6.4.2 Для проведения реакции секвенирования ДНК по Сэнгеру в пробирку для ПЦР вместимостью 0,2 см^3 вносят 4 мм^3 препарата с очищенным образцом по 5.6.4.1.

5.6.4.3 Пробирки ставят в амплификатор с термостатируемой крышкой (температура крышки — 110 °С постоянно) и запускают программу амплификации по следующей схеме:

а) предварительная денатурация ДНК — при температуре 95 °С в течение 2 мин;

б) синтез ПЦР-продуктов (60 циклов):

1) денатурация ДНК — при температуре 95 °С в течение 10 с,

2) отжиг праймеров — при температуре 52 °С в течение 10 с,

3) синтез цепи ДНК — при температуре 60 °С в течение 4 мин;

в) охлаждение — при температуре 12 °С постоянно.

Примечание — Допускается хранение продукта реакции секвенирования в закрытой микропробирке при температуре не выше минус 18 °С сроком не более 12 мес.

5.6.5 Определение последовательности нуклеотидов

5.6.5.1 Для обессоливания и очистки продукта секвенирования в предварительно подготовленную колонку типа Centri-Sep наносят образец, полученный по 5.6.4 в полном количестве, после чего центрифугируют при рекомендованной скорости.

5.6.5.2 В микропробирку вместимостью 0,2 $см^3$ вносят 10 $мм^3$ препарата с очищенным образцом по 5.6.5.1, добавляют 12 $мм^3$ высокоочищенного формамида, предназначенного для денатурации нуклеиновых кислот перед капиллярным электрофорезом.

5.6.5.3 Пробирку с образцом, растворенным в формамиде по 5.6.5.2, ставят в амплификатор и подвергают тепловой денатурации при температуре 95 °С в течение 2 мин.

5.6.5.4 Полученный анализируемый образец по 5.6.5.3 в формамиде переносят в 96-луночный планшет, закрывают уплотнителем и размещают в держателе для анализируемых образцов согласно инструкции по эксплуатации прибора для капиллярного электрофореза.

5.6.5.5 Подготовленный по 5.6.5.4 анализируемый образец, содержащий продукт секвенирования ДНК, разделяют методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора для капиллярного электрофореза. При этом выбирают протокол для секвенирования ДНК, рекомендуемый к данному прибору.

5.7 Обработка и оформление результатов идентификации

5.7.1 Все результаты идентификации оценивают по каждой пробе отдельно.

5.7.2 Для видовой идентификации сравнивают полученную по 5.6.5 последовательность нуклеотидов 3′ участка контрольного региона мтДНК с известными последовательностями в базе данных. Пример результатов секвенирования мтДНК приведен в приложении Д.

5.7.3 Таксономическую принадлежность (биологический вид) устанавливают на том уровне, который позволяют выявленные нуклеотидные различия.

5.7.4 Идентифицированным биологическим видом считают вид, чья последовательность нуклеотидов в базе данных максимально близка к полученной последовательности нуклеотидов и определяется как участок контрольного региона мтДНК рыб семейств Осетровые и Веслоносые. Идентичность I вычисляют по формуле

$$I = \left(\frac{N - n}{N}\right) \cdot 100\ \%, \qquad (1)$$

где N — общее число выровненных позиций двух последовательностей нуклеотидов;

n — число несовпадающих оснований в выровненных позициях двух последовательностей нуклеотидов.

Примечание — Пример результата сопоставления полученной последовательности с последовательностью в базе данных приведен в приложении Д.

5.7.5 Результаты идентификации икры рыб молекулярно-генетическим методом представляют в виде заключения по образцу, приведенному в приложении Е.

5.8 Контроль качества испытаний

5.8.1 Для оценки качества секвенирования, поиска причин и путей устранения проблем рекомендуется использовать таблицы устранения проблем, приведенные в описании и документации к используемому генетическому анализатору.

5.8.2 Корректность чтения нуклеотидов проверяют дополнительно вручную в целях исключения ошибки автоматического анализа. Исключают из анализа плохо читаемые из-за всплесков фона нуклеотиды в начале и конце хроматограммы.

5.8.3 Для контроля правильности измерения нуклеотидной последовательности генетическим анализатором рекомендуется периодическое использование контрольной последовательности ДНК, прилагаемой к набору секвенирования ДНК, не реже, чем каждые 90 сут или через каждые 960 циклов секвенирования на данном приборе согласно инструкции, прилагаемой к набору для секвенирования. Полученная последовательность должна совпадать с указанной. Разночтение не должно превышать 1 нуклеотида на каждые 100 нуклеотидов. Для последовательности в 750 нуклеотидов это составит 8 нуклеотидов.

Приложение А
(справочное)

Видовой состав рыб семейств Осетровые и Веслоносые с идентификационными кодами биологических видов

А.1 Видовой состав рыб семейств Осетровые и Веслоносые с идентификационными кодами биологических видов приведены в таблице А 1.

Таблица А.1

Наименование вида рыб		Код‡
Русское	Латинское	
Род «Белуга» — *Huso*		
Белуга**	*Huso huso*	HUS
Калуга***	*Huso dauricus*	DAU
Род «Осетр» — *Acipenser*		
Осетр адриатический*	*Acipenser naccari*	NAC
Осетр атлантический (балтийский)*	*Acipenser sturio*	STU
Осетр русский**	*Acipenser gueldenstaedtii*	GUE
Осетр персидский**	*Acipenser persicus*	PER
Севрюга**	*Acipenser stellatus*	STE
Шип**	*Acipenser nudiventris*	NUD
Стерлядь**/***	*Acipenser ruthenus*	RUT
Осетр сибирский***	*Acipenser baerii*	BAE
Осетр амурский***	*Acipenser schrenki*	SCH
Осетр китайский***	*Acipenser sinensis*	SIN
Осетр корейский***	*Acipenser dabryanus*	DAB
Осетр сахалинский***	*Acipenser mikadoi*	MIK
Осетр белый†	*Acipenser transmontanus*	TRA
Осетр тупорылый (малый) †	*Acipenser brevirostrum*	BVI
Осетр озерный†	*Acipenser fulvescens*	FUL
Осетр атлантический (остроносый) †	*Acipenser oxyrhynchus*	OXY
Осетр зеленый†	*Acipenser medirostris*	MED
Род «Веслонос» — *Polyodon*		
Веслонос американский†	*Polyodon spathula*	SPA

* Виды, обитающие в европейской части Евразии.
** Виды, обитающие в Понто-Каспийском регионе.
*** Виды, обитающие в Азиатской части Евразии.
† Виды, обитающие в водоемах Северной Америки.
‡ Рекомендации Резолюции 12.7 «Сохранение и торговля осетровыми и веслоносыми» Конференции Сторон Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения от 3 марта 1973 г. (СИТЕС).

Приложение Б
(справочное)

Морфологические признаки идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

Б.1 Макроструктурные морфологические признаки идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Наименование показателя	Характеристика пищевой рыбной продукции		
	Икра-зерно, овулировавшая икра	Икра зернистая, пастеризованная	Икра ястычная, паюсная
Внешний вид икринок	Непрозрачные		
Форма зерна	Округлая или яйцевидная		Вдавленная или угловатая, у отдельных икринок округлая
	—	Может быть: незначительно вдавленная	
Цвет икринок	Неоднородный, разнообразных оттенков от бледно-желтого или светло-серого до серо-коричневого или черного. У отдельных икринок может быть мраморoподобная окраска		
Полярность пигментации	Выражена четко, различается анимальный и вегетативный полюса	Выражена слабо	Неразличима или слабо выражена
Состояние икринок, зафиксированных кипячением	Икринки уплотнены, легко разрезаются на части с сохранением структурных признаков; жидкость после кипячения остается неокрашенной		
Состояние икринок, зафиксированных формалином	Икринки плотные, внешняя оболочка местами деформируется, сжимается, в фиксирующем растворе обнаруживаются плавающие белковые частицы белого цвета. Икринки легко разрезаются		
Состояние икринок, зафиксированных смесью Буэна	Икринки уплотнены, внешняя оболочка не меняется. Фиксирующий раствор не изменяет цвет. Икринки легко разрезаются		

Б.2 Микроструктурные морфологические признаки икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые приведены в таблице Б.2.

Таблица Б.2

Структурный элемент икринки	Наименование показателя	Характеристика пищевой рыбной продукции		
		Икра-зерно, овулировавшая икра	Икра зернистая, пастеризованная	Икра паюсная, ястычная
Оболочка	Состояние	Целая	Целая или с частичным нарушением целостности, набуханием, расслоением	
	Пигментация	Отсутствует		
	Пигментный слой	Равномерный или неравномерный по толщине		
Оболочка на срезе	Внешний вид	Прозрачная или полупрозрачная, многослойная		
	Структурированность	Наличие поверхностной студенистой и двух радиальных оболочек (наружной и внутренней)*		
Цитоплазма	Внешний вид	Непрозрачная, с наличием ядра или без ядра		
	Цвет	От матово-белого, янтарного, серо-желтого до темно-желтого		

Окончание таблицы Б.2

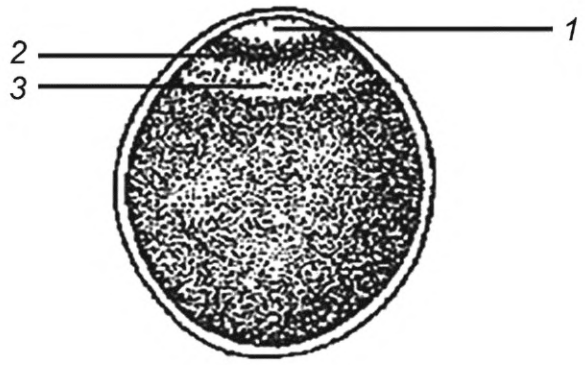
Структурный элемент икринки	Наименование показателя	Характеристика пищевой рыбной продукции		
		Икра-зерно, овулировавшая икра	Икра зернистая, пастеризованная	Икра паюсная, ястычная
Цитоплазма	Состояние	Однородная, заполняет все пространство внутри оболочки	Однородная. Возможно отслаивание от оболочек и заполнение полостей прозрачным или грязно-серым коллоидом	Частичное или полное нарушение однородности. Допустимо вытекание через разрывы оболочек
	Жир**	Наличие крупных и (или) мелких капель		
	Пигментный слой	Равномерный или неравномерный по толщине		
	Пигментные гранулы	Локализованы преимущественно в периферическом слое, в некоторых образцах могут диффундировать в глубь цитоплазмы		
Последовательность расположения структур	Пигментированных	Оболочка — пигментный слой — цитоплазма		
	Непигментированных	Оболочка — цитоплазма		
Микропилярный канал	—	От одного до нескольких десятков (часто от 3 до 10) в анимальной области икринки		

* Рассмотреть все три оболочки удается не во всех пробах.
** Для икры, прошедшей тепловую обработку.

Приложение В
(справочное)

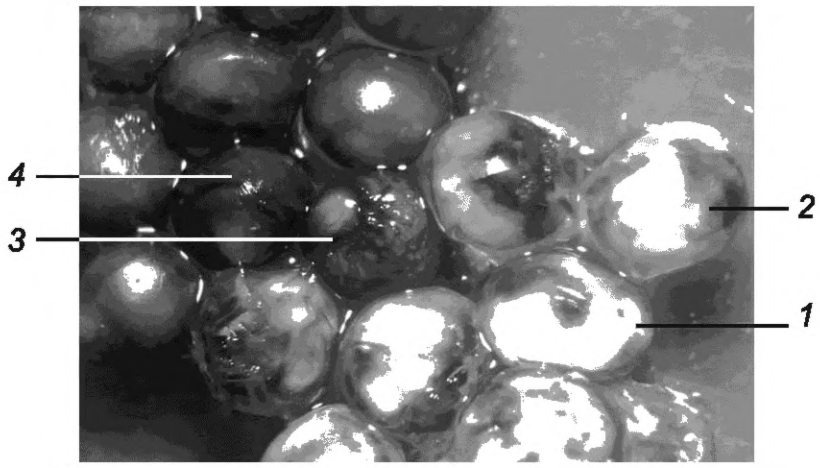
Внешнее и внутреннее строения икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

На рисунках В.1—В.7 представлены строения рыб семейств Осетровые и Веслоносые.



1 — светлое полярное пятно в анимальной области; *2* — темные пигментные кольца; *3* — фолликулярный эпителий

Рисунок В.1 — Внешний вид икринки белуги (схема)



1 — анимальная; *2* — вегетативная область икринки; *3* — светлое полярное пятно в анимальной области; *4* — пигментные кольца

Рисунок В.2 — Внешний вид пигментированных (слева) и непигментированных икринок русского осетра

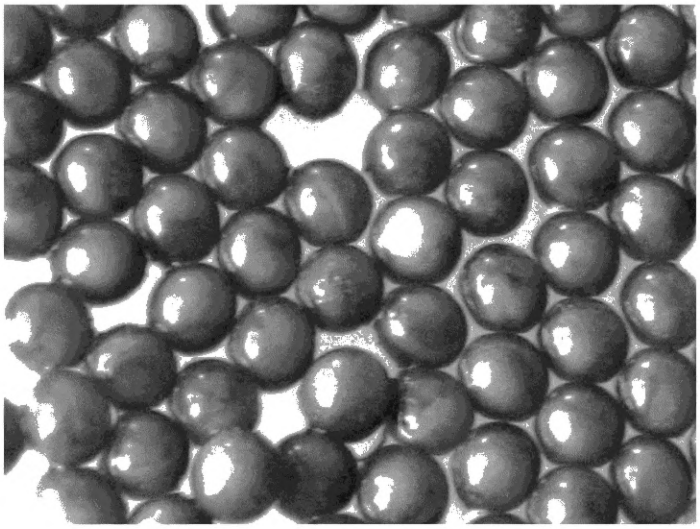
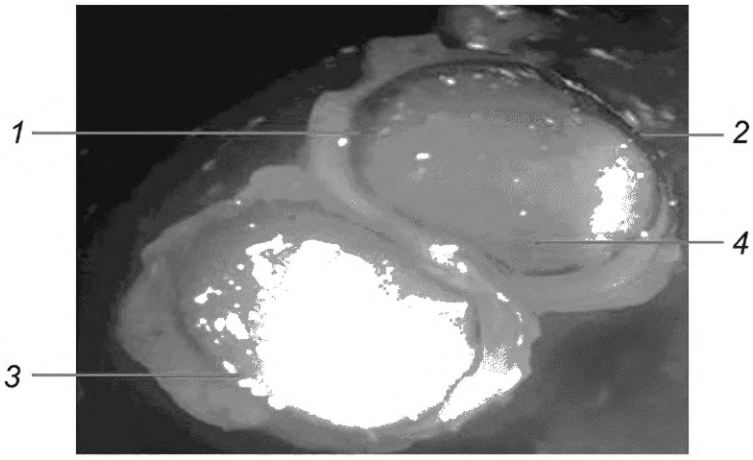
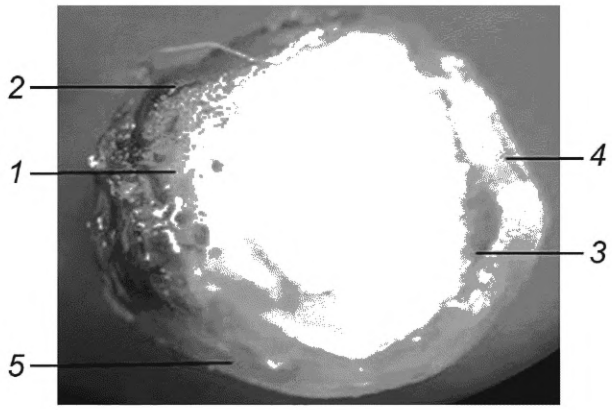


Рисунок В.3 — Мраморoподобная окраска икринок осетра



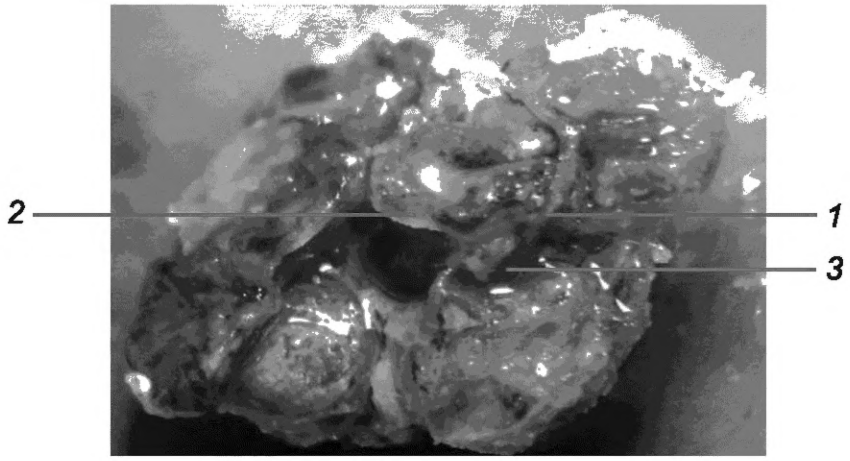
1 — ядро; *2* — оболочка; *3* — цитоплазма; *4* — расположение меланина в периферическом слое цитоплазмы

Рисунок В.4 — Срез икринки осетра (икра-сырец) из яичника IV стадии зрелости



1 — смещение меланина в глубь цитоплазмы; *2* — разрывы пигментного слоя, вызывающие эффект мраморoподобной окраски икринки; *3* — инфильтрация жидкости под оболочку; *4* — набухание оболочки; *5* — расслоение оболочки

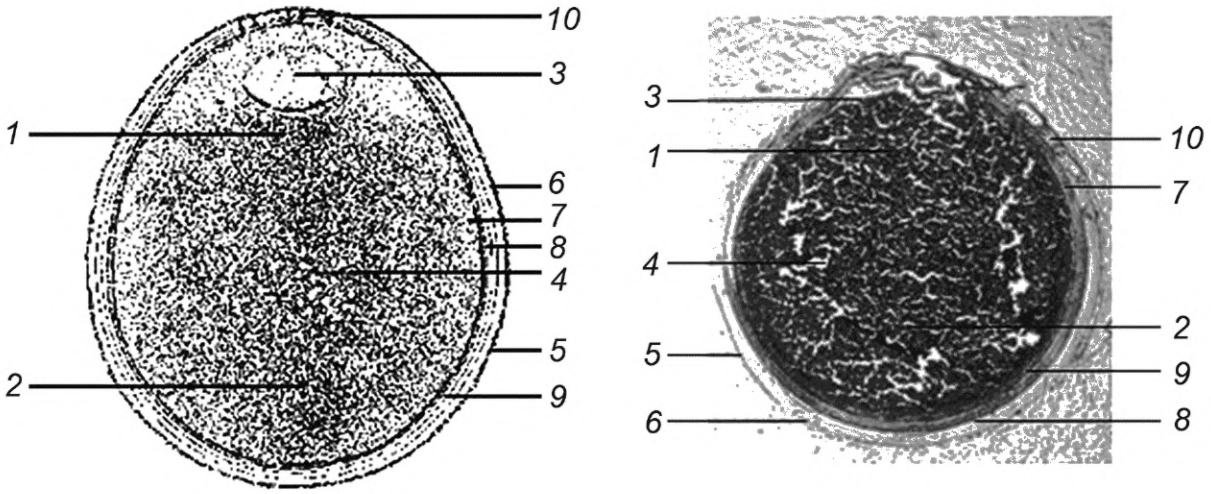
Рисунок В.5 — Срез икринки русского осетра (икра зернистая)



1 — слой пигмента под оболочкой; *2* — цитоплазма; *3* — заметно появление крупных капель жира

Примечание — Икринки сильно деформированы с разрывами оболочки.

Рисунок В.6 — Срез фрагмента паюсной икры



1 — анимальная область; *2* — вегетативная область; *3* — ядро; *4* — цитоплазма; *5* — фолликулярный эпителий; *6* — студенистая оболочка; *7* — наружная радиальная оболочка; *8* — внутренняя радиальная оболочка; *9* — пигментный слой; *10* — микро́пиле

Рисунок В.7 — Схема строения икринки осетровых рыб на срезе (разрез по анимально-вегетативной оси)

Приложение Г
(справочное)

Форма протокола идентификации образцов морфологическим методом

НАИМЕНОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ (ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ)

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от «_____»_____20_____г.

Даты: поступление на испытания «_____»_____20_____г.
окончание испытаний «_____»_____20_____г.

Наименование продукции:	
Маркировка, НД	
Производитель	
Предъявитель	
Сопроводительные документы	
Дата получения образца	
Отбор произведен, № акта отбора образца	
Основание на проведение испытаний	
Внутренний шифр образца	

РЕЗУЛЬТАТ ИСПЫТАНИЙ

Внутренний шифр образца	
Показатели макро- и микроструктурной характеристики образца	*Описание характеристик образца* *Заполняется по аналогии с характеристиками, приведенными в определительной таблице Б.1 и Б.2 (приложения Б), на основании данных по идентификации рассматриваемого образца*
Метод индентификации	
Идентифицирован как	

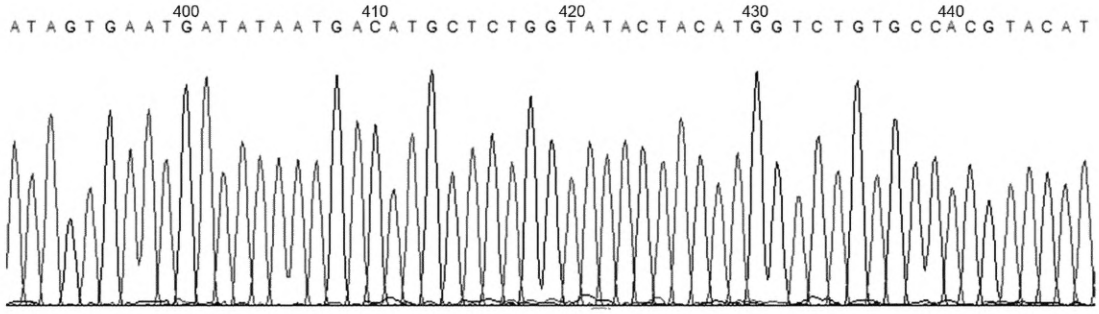
Исполнители: _____ _____ _____
должность *личная подпись* *инициалы, фамилия*

Руководитель: _____ _____ _____
должность *личная подпись* *инициалы, фамилия*

Протокол испытаний распространяется на образец, представленный на испытания.
Полное или частичное воспроизведение, а также передача протокола и его копий другим лицам без согласования с заказчиком и руководителем организации (испытательной лаборатории) не допускается

Приложение Д
(справочное)

Пример результатов секвенирования мтДНК



T — тимин; A — аденин; C — цитозин; G — гуанин

Рисунок Д.1 — Фрагмент последовательности нуклеотидов участка Д-петли мтДНК сибирского осетра (*Acipenser baerii*), полученный в результате секвенирования

Acipenser stellatus complete mitochondiral genome

Sequence ID: AJ585050.1 **Length:** 16537 **Number of Matches:** 1

Range 1: 16103 to 16514 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
761 bits(412)	0.0	412/412(100%)	0/412(0%)	Plus/Plus

```
Query  1      ATTCTTGTCTGTCTAGAACATGGGATTCATGAGATGAAGGACAATAATTGTGAGATTCCA  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16103  ATTCTTGTCTGTCTAGAACATGGGATTCATGAGATGAAGGACAATAATTGTGAGATTCCA  16162

Query  61     TAACTGAACTATTACTGGCATCTGGTTCCTATTTCAGGTCCATTGATAGTTATCTCCCCA  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16163  TAACTGAACTATTACTGGCATCTGGTTCCTATTTCAGGTCCATTGATAGTTATCTCCCCA  16222

Query  121    TAATCAGGTCGCTACTGGCATCTGATTAATGTTAGAGGTACCATAGGCCCACGCTCACAA  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16223  TAATCAGGTCGCTACTGGCATCTGATTAATGTTAGAGGTACCATAGGCCCACGCTCACAA  16282

Query  181    CATGCCAAGAACCCCACCAGCATTTGGTATTTTTATCTTTTGGGTCTCCATTCATTGACA  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16283  CATGCCAAGAACCCCACCAGCATTTGGTATTTTTATCTTTTGGGTCTCCATTCATTGACA  16342

Query  241    TATCAAAGCTCTACCAAGAGAAGGATAAGGTGGAACATTTGGTTTGTTCAAAAATGACAG  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16343  TATCAAAGCTCTACCAAGAGAAGGATAAGGTGGAACATTTGGTTTGTTCAAAAATGACAG  16402

Query  301    ATAGTGAATGACATAATGACATATCCTAAACACCACATACAAACCTGCGTTACATACATG  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16403  ATAGTGAATGACATAATGACATATCCTAAACACCACATACAAACCTGCGTTACATACATG  16462

Query  361    AGGAGTGTTTTCACGAGGCCTGGTCCTTTCTCCCTCACACATAAATGTTATA  412
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  16463  AGGAGTGTTTTCACGAGGCCTGGTCCTTTCTCCCTCACACATAAATGTTATA  16514
```

Рисунок Д.2 — Результат сравнения участка последовательности нуклеотидов мтДНК из GenBank (Sbjct), позволяющий провести идентификацию последовательности нуклеотидов исследуемой пробы (Query)

Приложение Е
(справочное)

Форма протокола идентификации образцов молекулярно-генетическим методом

НАИМЕНОВАНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ (ИСПЫТАТЕЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ)

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от «_____»_____20_____г.

Даты: поступление на испытания «_____»_____20_____г.

окончание испытаний «_____»_____20_____г.

Наименование продукции:	
Маркировка, НД	
Производитель	
Предъявитель	
Сопроводительные документы	
Дата получения образца	
Отбор произведен, № акта отбора образца	
Основание на проведение испытаний	
Внутренний шифр образца	

РЕЗУЛЬТАТ ИСПЫТАНИЙ

Внутренний шифр образца	
Метод идентификации*	
Идентифицирован как	

** Молекулярно-генетический метод настоящего стандарта позволяет установить видовую принадлежность, наследуемую по материнской линии. Метод не позволяет сделать вывод о возможном гибридном происхождении исследуемого образца. Протокол испытаний распространяется на образец, представленный на испытания.*

Полное или частичное воспроизведение, а также передача протокола и его копий другим лицам без согласования с заказчиком и руководителем организации (испытательной лаборатории) не допускается.

Исполнители: _____ _____ _____
должность *личная подпись* *инициалы, фамилия*

Руководитель: _____ _____ _____
должность *личная подпись* *инициалы, фамилия*

Библиография

[1] Технический регламент Евразийского экономического союза ТР ЕАЭС 040/2016 — О безопасности рыбы и рыбной продукции

[2] Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 — О безопасности пищевой продукции

УДК 664.955.2:577.21:006:86 МКС 67.120.30

Ключевые слова: пищевая рыбная продукция, методы идентификации, морфологический метод, молекулярно-генетический метод, икра рыб семейств Осетровые и Веслоносые

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 29.11.2021. Подписано в печать 28.12.2021. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,95.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ 30812—2021 Продукция рыбная пищевая. Методы идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

Дата введения — 2021—11—12

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Таблица согласования	—	Азербайджан | AZ | Азстандарт

(ИУС № 3 2022 г.)

Поправка к ГОСТ 30812—2021 Продукция рыбная пищевая. Методы идентификации икры рыб семейств Осетровые и Веслоносые

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 8 2022 г.)

gost.e-ecolog.ru