ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

Биологиялық қауіпсіздік
Шикізат және тамақ өнімдері

ӨСІМДІК ТЕКТІ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТҮРЛЕНДІРІЛГЕН КӨЗДЕРДІ (ГТК) БІРДЕЙЛЕНДІРУ ӘДІСІ

ҚР СТ 1346-2005
(Р ГОСТ 52173-2003, MOD)

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің
Техникалық реттеу және метрология жөніндегі комитеті
(Мемстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

Алғысөз

1 Техникалық реттеу және метрология жөніндегі комитетінің «Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты» республикалық мемлекеттік кәсіпорны **ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Индустрия және сауда министрлігінің Техникалық реттеу және метрология жөніндегі комитетінің 2005 жылдың 1 қыркүйегіндегі № 237 бұйрығымен **БЕКІТІЛІП ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 БІРІНШІ ТЕКСЕРУ МЕРЗІМІ **2010 жыл**
ТЕКСЕРУ КЕЗЕҢДІЛІГІ **5 жыл**

4 Осы стандарт «Тамақ өнімдерінің сапасы және қауіпсіздігі туралы» Қазақстан Республикасы заңына сәйкес Р ГОСТ 52173-2003 қолданылған терминологияны келтіру жолымен, сонымен қатар ҚР СТ 1.5-2004 Қазақстан Республикасының мемлекеттік техникалық реттеу жүйесі. Стандарттардың құрылуына, баяндалуына, ресімделуіне және мазмұнына қойылатын жалпы талаптарға сәйкес стандарттың және оның мазмұнының құрылымдық элементтері ішінара өзгеруімен ГОСТ Р 52173-2003 Шикізат және тамақ өнімдері. Өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру әдісіне қатысты түрлендірілген болып табылады. Мәтін бойынша көрсетілген өзгертулер көлбеу қаріппен белгіленген.

5 Осы стандартта «Техникалық реттеу туралы», «Қазақстан Республикасында денсаулық сақтау туралы», Санитарлық-эпидемиологиялық саулық туралы, Тамақ өнімдерінің сапасы және қауіпсіздігі туралы, Тұтынушылардың құқығын қорғау туралы Қазақстан Республикасы заңы жүзеге асырылды

6 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

Осы стандарт Қазақстан Республикасының Индустрия және сауда министрлігі Техникалық реттеу және метрология жөніндегі комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай немесе бөлшектеп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

Биологиялық қауіпсіздік
Шикізат және тамақ өнімдері

ӨСІМДІК ТЕКТІ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТҮРЛЕНДІРІЛГЕН КӨЗДЕРДІ (ГТК) БІРДЕЙЛЕНДІРУ ӘДІСІ

Енгізілген күні 2006-07-01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт шикізатқа және тамақ өнімдеріне (бұдан әрі қарай - өнім) таралады және Өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру әдісін белгілейді.

Әдіс тиісті праймерлермен полимераздық тізбекті әсерде (ПТӘ) негізделген.

2 Нормативтік сілтемелер

Осы стандартта келесі стандарттарға сілтемелер пайдаланылған:

ҚР СТ* Биологиялық қауіпсіздік. Шикізат және тамақ өнімі. Биологиялық микрочип қолданып өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру әдісі.

ҚР СТ Р ГОСТ 51810-2004 Тұтынушыларға сататын жаңа піскен қызанақтар. Техникалық шарттар.

ГОСТ 12.1.004-91 Еңбек қауіпсіздігінің стандарттар жүйесі. Өрт қауіпсіздігі. Жалпы талаптар.

ГОСТ 12.1.005-88 Еңбек қауіпсіздігінің стандарттар жүйесі. Жұмыстық ауасы аумағына қойылатын жалпы санитарлық-гигиеналық талаптар.

ГОСТ 12.1.007-76 Еңбек қауіпсіздігінің стандарттар жүйесі. Зиянды заттар. Жіктеу және жалпы қауіпсіздік талаптары.

ГОСТ 12.1.019-79 Еңбек қауіпсіздігінің стандарттар жүйесі. Электр қауіпсіздігі. Жіктеу және қауіпсіздік Жалпы талаптар және қорғау түрлерінің номенклатурасы.

ГОСТ 12.4.009-83 Еңбек қауіпсіздігінің стандарттар жүйесі. Объектілерді қорғауға арналған өрт техникасы. Негізгі түрлері. Орналастыру және қызмет көрсету.

* Стандарт әзірленуде

ГОСТ 12.4.021-75 Еңбек кауіпсіздігінің стандарттар жүйесі. Желдеткіш жүйелер. Жалпы талаптар.

ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) Өлшеуіш зертханалық шыны ыдыстар. Цилиндрлер, мензуркалар, колбалар, шыны түтіктер. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 3118-77 Тұз қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 3164-78 Медициналық вазелин майы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 4233-77 Хлорлы натрий. Техникалық шарттар.

ГОСТ 4328-77 Натрий гидрототығы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9656-75 Бор қышқылы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 6709-72 Тазартылған су. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9805-84 Изокрил спирті. Техникалық шарттар.

ГОСТ 12026-76 Сүзгіш зертханалық қағаз. Техникалық шарттар.

ГОСТ 12738-77 Градуирленген мойыны бар шыны колбалар. Техникалық шарттар.

ГОСТ 14919-83 Электроплиталар, электроплиткалар және тұрмыстық қуыратын электр шкафтар. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Техникалық шарттар.

ГОСТ 21400-75 Химия - зертханалық әйнек. Техникалық талаптар. Сынау әдістері.

ГОСТ 24104-2001 Зертханалық таразылар. Жалпы техникалық талаптар.

ГОСТ 25336-82 Зертханалық шыны ыдыстар және жабдықтар. Тұрпаттар, негізгі параметрлер және өлшемдер.

ГОСТ 26678-85 Тұрмыстық электр компрессті параметрлік қатардағы тоңазытқыштар және мұздатқыштар. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ Р 51652-2000 Тамақ шикізатынан жасалған тазартылған этил спирті. Техникалық шарттар.

3 Терминдер, анықтамалар және қысқартулар

3.1 Осы стандартта ҚР СТ* сәйкес терминдер мен анықтамалар қолданылады.

Оларға қосымша осы стандартта мына терминдер қолданылады:

Тамаққа генетикалық түрлендірілген көздер: генетикалық түрлендірілген организмдерден алынған табиғи немесе өңделген түрінде адам тамаққа қолданылатын тамақ өнімдері (компоненттер);

3.2 Осы стандартта келесі қысқартулар қолданылады:

- ПТӘ - полимеразды тізбекті әсер;

- БСА - бұқа сарсуының құрғақ альбумині;

- ГМИ – генетикалық түрлендірілген көздер.

4 Аппаратура, материалдар және реактивтер

4.1Сыйымдылығы 0,2; 0,5; 1,5 $см^3$ белсенді элементті қызыту/салқындату жылдамдығы 1,5 °С/с [1] кем емес Эппендорф тұрпатты микроцентрифугты түтіктер үшін «Терцик МС-2» тұрпатты амплификатор.

4.2 Кювет және адырлар жинағымен «Mini-Sub Cell GT System» тұрпатты көлденең электрофорезге арналған құрал [2].

4.3 Реттелетін кернеудің ауқымы (50-300) «Power Pac 300» тұрпатты кернеу көзі [3].

4.4 Видеосистема типа «Gel Doc 2000™», Бромды этидиймен боялған, гельдегі ДНК люминисцирлейтін іздерінің бейнелерін талдау және құжаттау: сәулелену ауқымы (300-400) нм, сезімталдығы — 10 нг ДНК кем емес (бромды этидий бойынша) [4].

4.5 Тұрмыстық электр тоңазытқыш ГОСТ 26678 бойынша.

4.6 Минус 20°С температураны қамтамасыз ететін ± 0,5 ^{0}С қателікпен мұздататын камера.

4.7 Эппендорф тұрпатты үстелге қоятын микроцентрифуга (айналу жиілігі 12000 $мин^{-1}$кем емес) [5].

4.8 Сыйымдылығы 0,5 және 1,5 $см^3$, температура ауқымы 15 °С тан 120 °С дейін, ұя саны - әр тұрпатты 20 кем емес, температураны ұстау дәлдігі - 0,2 °С, көрші ұялар арасындағы айырмашылық 0,5 °С көп емес Эппендорф тұрпатты микроцентрифуга үшін «TERMO 24-15» тұрпатты термостат [6].

4.9 «Вортекс» тұрпатты сілкуге арналған аппарат, айналым жылдамдығы (250—3000) $мин^{-1}$.

4.10 Микротолқынды пеш (қуаты 400 Вт кем емес).

4.11 Ең көп өлшеу шегі 200 г дәлдіктің жоғары сыныбының (шарттық белгісі II) жалпыға арналған зертханалық таразылары ГОСТ 24104 бойынша.

4.12Су моншасы [7].

4.13 қателігі ±0,1 pH электродтар жинағымен pH-метр.

4.14 Мөлшерлеудің ауыспалы көлемімен дозаторлар:

- (0,2—2,0) $мм^3$, қадамы 0,01 $мм^3$, дәлдігі +1,2 %;
- (0,5—10,0) $мм^3$, қадамы 0,01 $мм^3$, дәлдігі ±0,8;
- (2—20) $мм^3$, қадамы 0,01 $мм^3$, дәлдігі ±0,8 %;
- (20—200) $мм^3$, қадамы 0,1 $мм^3$, дәлдігі ±0,6 %;
- (100—1000) $мм^3$, қадамы 1 $мм^3$, дәлдігі ±3 %;
- (2—10) $см^3$, қадамы 0,1 $см^3$, дәлдігі ±0,5 %.

4.15 Сыйымдылығы 0,2; 0,5 және 1,5 $см^3$ Эппендорф тұрпатты микроцентрифугалық түтіктер

4.16 Мөлшерлеудің ауыспалы көлемі 10; 20; 200; 1000 $мм^3$дейін; 10 $см^3$ дозаторларға арналған сүзгіші бар ұштар

4.17 Сыйымдылығы 25; 50; 100; 200 дейін; 1000 $см^3$ өлшеуіш түбі жалпақ конусты шыны түтіктер ГОСТ 12738 бойынша.

4.18 25; 100; 1000 $см^3$ зертханалық өлшеуіш шыны цилиндрлер ГОСТ 1770 бойынша.

4.19 Сыйымдылығы 1,5 $см^3$ микроцентрифугалық түтіктің өлшеміне ГОСТ 21400 бойынша тефлонды пестик немесе шыны таяқша

4.20 Зертханалық сүзгіш қағаз ГОСТ 12026 бойынша.

4.21 Тұз қышқылы ГОСТ 3118 бойынша, х. ч.

4.22 Бор қышқылы ГОСТ 9656 бойынша, х. ч.

4.23 Этилендиаминтетра сірке қышқылы (ЭДТА), х. ч. [8].

4.24 Гексадецилтриметиламмониум бромид [9].

4.25 Натрий гидрототығы ГОСТ 4328 бойынша, х. ч.

4.26 Хлорлы натрий ГОСТ 4233 бойынша, х. ч.

4.27 Тазартылған этил спирті ГОСТ Р 51652 бойынша, х. ч.

4.28 Изопропиленді спирт, х. ч. [10].

4.29 Медициналық вазелин майы ГОСТ 3164 бойынша.

4.30 Хлороформ ГОСТ 20015 бойынша, х. ч.

4.31 Тазартылған су ГОСТ 6709 бойынша.

4.32 Иондалмаған су [11].

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

4.34 2-меркаптоэтанол, х. ч. [13].

4.35 Бромды этидий, х. ч. [14].

4.36 Бұқа сарсуының құрғақ альбумині (БСА) [15].

4.37 Термотұрақты фермент Taq-полимераза, (70 - 72) °С саласындағы жұмыс оптимумы [16].

4.38ПЦР буфер [17].

4.39 Электрофорезге арналған агароза (тип II) [18].

4.40 ДНК салмағының молекулярлық маркері [19].

4.41 Өсімдік текті тамақтың генетикалық түрлендірілген көздері (ГТК) құрамының стандартты үлгісі (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0) [20].

4.42 Өсімдік текті тамақтың генетикалық түрлендірілген көздері (ГТК) құрамының стандартты үлгісі (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5) [21].

4.43 Нуклеотидтер:

үшфосфорлы қышқылдың 2'-дезоксиаденозин-5' тетранатрийлі тұзы, тригидрат (АТФ) [22];

үшфосфорлы қышқылдың 2'-дезоксицитидин-5' тетранатрийлі тұзы тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ) [23];

үшфосфорлы қышқылдың 2'-дезоксигуанозин-5' тетранатрийлі тұзы, тригидрат (ГТФ) [24];

үшфосфорлы қышқылдың 2'-дезокситимидин-5' тетранатрийлі тұзы, тригидрат (ТТФ) [25];

4.44 Промоторға праймерлер *35S* [26]:

- *35S-15*'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3';
- *35S-25*'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'.

4.45Терминатор *nos* праймерлер [27]:

- *nos*-15'GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3';
- *nos*-25' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'.

Жоғарыда көрсетілгендерге ұқсас техникалық сипаттамаларымен метрологиялық сипаттамалары және жабдықтары бар басқа өлшеу құралдарын, сонымен қатар ұқсас бақылау нәтижелерін алуды және сынау жүргізумен айналысатын персонал қауіпсіздігін қамтамасыз ететін сынау кезінде қолданылатын реактивтерді және материалды қолдануға рұқсат етіледі.

5 Сынамаларды таңдау

Сынамаларды іріктеуді тамақ шикізаттарының және тамақ өнімдерінің біркелкі өнім топтарына арналған сынамаларды іріктеу тәртібін белгілейтін техникалық реттеу саласындағы нормативтік құқықтық актілер, стандарттар және басқа нормативтік құжаттар бойынша жүргізеді.

6 Талдау жүргізуге дайындау

6.1 Ерітінділерді дайындау

6.1.1 Концентрациясы *с* (Трис-HCl)=1 моль/дм^3 ерітінділерді дайындау.

Өлшеуіш колбаға ГОСТ 12738 бойынша сыйымдылығы 100 см^3 (12,11 ± 0,01) г. Трис (оксиметил) аминометанды 4.33 бойынша салады, [12] 4.32, [11] бойынша 80 см^3 иондалмаған суда ерітеді. Маңыздандырылған тұз қышқылын ГОСТ 3118 бойынша pH ерітіндіні 7,5 дейін жеткізеді, сосын иондалмаған судың белгісіне дейін жеткізіп араластырады. Тоңазытқышта сақтау мерзімі ГОСТ 26678 бойынша 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.2 Концентрациясы *с* (NaCl) ерітіндіні дайындау = 5 моль/дм^3

Сыйымдылығы 100 см^3 өлшеуіш колбаға (29,22± 0,01) г хлорлы натрийді ГОСТ 4233 бойынша салады, иондалмаған судың 80 см^3 шамасында ерітеді, иондалмаған судың белгісіне дейін жеткізіп араластырады. Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.3 Концентрациясы *с* (NaOH) = 30 % ерітіндіні дайындау

Сыйымдылығы 50 см^3 колбаға ГОСТ 1770 бойынша (3± 0,01) г натрий гидрототығын салады, ГОСТ 4328 бойынша, 7 см^3 иондалмаған суда ерітеді. Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.4 Концентрациясы *с* (ЭДТА) = 0,5 моль/дм^3 ерітіндіні дайындау

Сыйымдылығы 100 см^3 колбаға (14,62± 0,01) г этилендиаминтетра сірке қышқылын по 4.23, [8] салады, иондалмаған судың 80 см^3 шамасында ерітеді. 6.1.3 бойынша дайындалған натрий гидрототығының ерітіндісімен, pH ерітіндісін 8,0 дейін иондалмаған сумен белгіге дейін жеткізіп араластырады.

Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.5 Лизирлейтін буферді дайындау

Сыйымдылығы 25 см^3 өлшеуіш колбаға ГОСТ 1770 бойынша (0,5±0,001) г гексадецилтриме-тиламмония бромидін салады, 10 см^3 иондалмаған суда ерітеді, автоматты микродозатормен 6.1.1 дайындалған 2,5 см^3 Трис-HCl ерітіндіні қосады, 6.1.2, 1 см^3 бойынша дайындалған 7 см^3 хлорлы натрий ерітіндісін, 6.1.4 бойынша дайындалған ЭДТА ерітіндісін иондалмаған сумен белгіге дейін жеткізіп араластырады.

Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес. Сақтау кезінде жауын-шашын болған кезде ерітіндіні бөлме температурасында ұстайды немесе термостатта 4.8 бойынша, [6] 65 °С температурада толық ерігенге дейін жылытады.

Тікелей пайдалану алдында дайындалған ерітіндіге автоматты микродозатормен меркаптоэтанолды 4.34 бойынша, [13] 1 см^3 лизирлететін буферге 4 мм^3 есебінен қосады және араластырады.

6.1.6 Сумен қаныққан хлороформды дайындау

Сыйымдылығы 200 см^3 колбаға цилиндрмен ГОСТ 1770 бойынша (100±0,1) см^3 хлороформды ГОСТ 20015 бойынша енгізеді, 20 см^3 иондалмаған суды ГОСТ 6709 қосады, мұқият араластырады және қанығу үшін 24 с қалдырады.

Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.7 70 %-ды тазартылған этил спирттің ерітіндісін дайындау

Сыйымдылығы 200 см^3 колбаға (70 ±0,1) см^3 цилиндрмен 96 %-ды тазартылған этил спиртін по ГОСТ Р 51652 бойынша, 26 см^3 иондалмаған суды қосып араластырады. Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.8 Концентрациясы *с* (БСА) = 20 мкг/см^{3}ерітіндіні дайындау

Сыйымдылығы 1,5 см^3 Эппендорф тұрпатты түтікке (0,002±0,01) г құрғақ БСА 4.36, [15] бойынша салады, 1 см^3 иондалмаған суды қосады, толық ерігенше араластырады. 10 мм^3 дайындалған ерітіндіні іріктейді және сыйымдылығы 1,5 см^3 Эппендорф тұрпатты түтікке тасымалдайды, 1 см^3 иондалмаған суды қосып араластырады.

Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.9 Концентрациясы *с* = 4 ммоль/дм^3 нуклеотидтер қоспасын дайындау

Сыйымдылығы 0,2 см^3 микро центрифугалы түтікке (1 ±0,01) мм^3 АТФ (концентрациясы 100 ммоль/дм^3) 4.43, [22] бойынша, (1 ±0,01) мм^3 ГТФ (концентрациясы 100 ммоль/дм^3) 4.43 бойынша, [24], (1 ±0,01) 1 мм^3 ЦТФ

(концентрациясы 100 ммоль/дм^3) 4.43 бойынша, [23], (1 ±0,01) мм^3 ТТФ (концентрациясы 100 ммоль/дм^3) 4.43 бойынша, [25] (96±0,1) мм^3 иондалмаған суды енгізеді, қоспаны араластырады.

Сақтау мерзімі минус 20 °С температурада — бір жылдан көп емес.

6.1.10 Электрофорезге арналған буферді 1-ТВЕ дайындау

Сыйымдылығы 1000 см^3 өлшеуіш колбаға (10,8 ±0,01) г Трис (оксиметил) аминометанды, 5,5 г бор қышқылын ГОСТ 9656 бойынша және (0,92±0,01) г этилендиаминтетра сірке қышқылын енгізеді, иондалмаған сумен белгісіне дейін жеткізеді толық ерігенше араластырады.

Сақтау мерзімі бөлме температурасында — 1 айдан көп емес.

6.1.11 Концентрациясы c ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 10 мг/см^3 ерітіндіні дайындау

Сыйымдылығы 100 см^3 өлшеуіш колбаға (1±0,01) г бромды этидийді 4.35,бойынша салады [14], ерітеді және иондалған сумен белгіге дейін жеткізеді.

Сақтау мерзімі 4 °С тен 5 °С дейін температурада — 12 айдан көп емес.

6.1.12 2 %-ды агарозды гельді дайындау

6.1.12.1 Сыйымдылығы 200 см^3 кем мес түбі жалпақ колбаға (1±0,01) г агарозаны 4.39 бойынша салады, [18], 6.1.10 бойынша дайындалған 1-ТВЕ50 см^3 қосады, мұқият сілкіп араластырады. Қоспасы бар колбаны микротолқынды пеште 4.10 бойынша немесе су моншасында 100 °С температурада қызытады және агароза толық ерігенше қайнатады.

6.1.12.2 6.1.12.1бойынша дайындалған, ерітілген агарозаны 50 °С дейін бөлме температурасында салқындатады, автоматты микродозатормен 6.1.11 бойынша дайындалған 5 мм^3 бромды этидий ерітіндісін қосады, мұқият араластырады.

6.1.12.3 6.1.12.2 бойынша алынған біркелкі қоспаны электрофорезге арналған кюветтерге құяды және адыр көмегімен қалталарға қалыптастырады. Гель салқындағаннан кейін (15—30) мин соң адырды жояды.

6.1.10 бойынша дайындалған электрофорезге арналған буферде1-ТВЕ, тоңазытқыштарда 4 °С тен до 5 °С дейін температурада — 7 тәуліктен көп емес сақтауға болады.

6.2 Сынамаларды дайындау

6.2.1 Талданатын өнімнің екі ілінбесін, өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген көздер құрамының стандартты үлгісінің ілінбесін (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0) по 4.41, [20] және өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген көздер құрамының стандартты үлгісінің ілінбесін (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5) по 4.42, [21] әр бірінің салмағы 70 тен 80 мг дейін сыйымдылығы 1,5 см^3 Эппендорф тұрпатты төрт микро центрифугалы түтікке салады. Дозатор көмегімен меркаптоэтанолом по 6.1.5 бойынша меркаптоэтанолонмен

лизирленетін буферді әр қайсысына 200 мм^3 ден қосуды, дереу тефлон былғауышпен қоспаны біркелкі қосаға дейін езеді. Әр микроцентрифугалық түтікке 600 мм^3 ден меркаптоэтанолонмен лизирленетін буферді қосады. Қоспаны мұқият тефлон былғауышпен түйін болмайтындай араластырады. Сосын қоспаны «Вортекс» тұрпатты аппаратта сілку үшін 30 с ішінде араластырады.

6.2.2 6.2.1т. бойынша дайындалған қоспаны термостатқа салады, 65 °С температурада (40—60) мин инкубациялайды, сосын қайтадан сілку үшін 30 с аппаратта араластырады және 7 мин Эппендорф тұрпатты үстел шағын центрифугада 4.7 бойынша айналым жиілігі (12000-13000) мин$^{-1}$ центрифугалайды, [5].

6.2.3 6.2.2 бойынша дайындалған қоспалардың тұнба бетіндегі сұйықтықтарды тұнбадан суспензия бөліктерін алмай сыйымдылығы 1,5 см^{3}төрт таза микро центрифугалы түтікке салады. Сосын әр микро центрифугалы түтікке 6.1.6 бойынша дайындалған 400 мм^3 ден хлорофорды қосады, сілку үшін суспензия болғанша аппаратта 30 с сілкиді. Алынған суспензияны айналым жиілігі 12000 мин$^{-1}$ 7 мин Эппендорф тұрпатты үстел микроцентрифугада бөлме температурасында центрифугалайды.

6.2.4Төрт түтіктен 6.2.3 бойынша дайындалған жоғарғы қабаттарын (су фазаларын) хлороформ қабатын алмай сыйымдылығы 1,5 см^3 төрт таза микроцентрифугалық түтіктерге аударады. Хлороформмен экстракцияны және 6.2.3 бойынша центрифугалауды екі мәрте қайталайды. 6.2.4 бойынша дайындалған жоғарғы қабаттарын сыйымдылығы 1,5 см^3 центрифугалық түтіктерге аударады, әрқайсысына минус 20 °С температураға дейін алдын ала салқындатылған мұздатқыш камераға 600 мм^3 ден изопропилен спиртін 4.28 бойынша қосады, [10 және 30 с. сілку үшін аппаратта араластырады

Алынған қоспаларды минус 20 °С мұздатқыш камераға дезоксирибонуклеин қышқылының (ДНК) тұнбасы пайда болуы үшін 30 мин кем емес салады.

Осы кезеңде минус 20 °С температурада тоңазытқыш камерада 12с дейін алынған қоспаларды сақтауға рұқсат етіледі.

6.2.6 Айналым жиілігі 12000 мин$^{-1}$ 6.2.5 бойынша дайындалған қоспаларды бөлме температурасында 6 мин центрифугалайды. Байқап тұнба бетіндегі сұйықтықты алып тастайды. Әр тұнбаны 6.1.7 бойынша дайындалған, (15—20) с сілкуге арналған аппаратта тұнбаларды араластырып және айналым жиілігі 12000 мин$^{-1}$ шағын центрифугада 6 мин. центрифугалап (2—3) рет 200 мм^3 70 %-ды тазартылған этил спиртімен жуады. Мұқият (соңғы тамшыға дейін) тұнба бетіндегі сұйықтықты алып тастайды.

6.2.7 6.2.6 бойынша дайындалған тұнбаларды (50—100) мм^3 иондалмаған суда ерітеді және ДНК ерітіндісін алады.

6.2.7 бойынша дайындалған ДНК ерітіндісін ПЦР жүргізу үшін тікелей қолданылады немесе тоңазытқыш камерада мерзімі бір жылға дейін минус 20 °С температурада сақтайды.

6.3 № 1 және № 2 реакциялық қоспаларды дайындау

6.3.1 Бес сынамаға № 1 реакциялық қоспаларды дайындау

Мұзбен кюветке салынған сыйымдылығы (1,5 ±0,1) $см^3$, микро центрифугалы түтікке (312,5±0,1) $мм^3$ иондалмаған суды, 52,5 $мм^3$ 10 магний хлориді бар ПЦР үшін буферлерді 4.38 бойынша, [17], (26±0,1) $мм^3$ 6.1.9, бойынша дайындалған нуклеотид қоспаларын (13 ±0,1) $мм^3$ праймері *35S-1* (концентрациясы 20 мкмоль/$дм^3$) 4.44 бойынша, [26], (13 ±0,1) $мм^3$ праймері *35S*-2 (концентрациясы 20 мкмоль/$дм^3$) 4.44 бойынша, [26], (2,5±0,1) $мм^3$ Taq-полимераза ферментімен (концентрациясы 5 ед/$мм^3$) 4.37 бойынша, [16], (52,5 ±0,1) $мм^3$ 6.1.8 бойынша дайындалған БСА ерітіндіні енгізеді. Қоспаны сілкуге арналған аппаратта көбіктер немесе көбікшелер пайда болдырмай 5 с араластырады.

6.3.2 № 2 Бес сынамаларға реакциялық қоспаларды дайындау

Мұзы бар кюветке салынған сыйымдылығы 1,5 $см^3$ микро центрифугалы түтікке 312,5 $мм^3$ иондалмаған суды, 52,5 $мм^3$ 10 хлорид магниті бар ПЦР арналған буферді, 26 $мм^3$ 6.1.9, 13 $мм^3$ бойынша дайындалған нуклеотидтер қоспасын *nos*-1 терминатор праймерін (концентрациясы 20 мкмоль/$дм^3$) 4.45, [27], 13 $мм^3$ *nos*-2 (концентрациясы терминатор праймерін 20 мкмоль/$дм^3$) 4.45, [27] бойынша, (концентрациясы 5 ед/$мм^3$) 2,5 $мм^3$ Taq-полимераза ферменті, 6.1.8 бойынша дайындалған 52,5 $мм^3$ БСА ерітіндісін енгізеді. Қоспаны сілкуге арналған аппаратта көбіктер немесе көбікшелер пайда болдырмай 5 с араластырады.

6.3.3 6.3.1 және 6.3.2дайындалған № 1 және № 2 реакциялық қоспаларды, 30 с айналым жиілігі 3000 $мин^{-1}$үстел шағынцентрифугада центрифугалайды. № 1 реакциялық қоспаларды сыйымдылығы 0,2 $см^3$ (немесе 0,5 $см^3$ пайдаланылатын амплификатор тұрпатына байланысты) 90 $мм^3$ нан бес микроцентрифугалық түтікке ПЦР жүргізу үшін құяды. № 2 реакциялық қоспаларды сыйымдылығы 0,2 $см^3$ (немесе 0,5 $см^3$ пайдаланылатын амплификатор тұрпатына байланысты) 90 $мм^3$ нан бес микроцентрифугалық түтікке ПЦР жүргізу үшін құяды. № 1 және № 2 реакциялық қоспаларды тікелей ПЦР жүргізу алдында дайындайды.

7 Талдау жүргізу

7.1 № 1 реакциялық қоспалары бар алғашқы екі түтікке және № 2 реакциялық қоспалары бар алғашқы екі түтікке ДНК, 6.2.1.1—6.2.1.7 дайынша дайындалған, әрқайсысына 2 $мм^3$ талданатын өнімнен бөлінген ДНК ерітіндісін автоматты шағын дозатормен қосады.

№ 1 реакциялық қоспалары бар үшінші түтікке және № 2 реакциялық қоспалары бар үшінші түтікке әр біріне өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген құрамның стандарттық үлгісінен бөлінген (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0), по 2 мм^3 ДНК ерітіндісін автоматты шағын дозатормен қосады.

№ 1 реакциялық қоспалары бар төртінші түтікке және № 2 реакциялық қоспалары бар төртінші түтікке әр біріне өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген құрамның стандарттық үлгісінен бөлінген (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), по 2 мм^3 ДНК ерітіндісін автоматты шағын дозатормен қосады.

№ 1 реакциялық қоспалары бар бесінші түтікке және № 2 реакциялық қоспалары бар бесінші түтікке автоматты шағын дозатормен әр біріне 2 мм^3 иондалмаған суды қосады — бос тәжірибе.

7.2 Қоспалары бар әр түтікке 7.1 бойынша бір тамшыдан (20-40) мм^3 вазелин майын ГОСТ 3164 бойынша қосады.

7.3 7.2 бойынша дайындалған қоспалары бар түтікті ПЦР жүргізу үшін амплификатор салады. *35S* қарауға праймерлер үшін амплификациясы бағдарламасы 1 кестеде, терминаторға *nos* — 2 кестеде келтірілген.

1Кесте — *35S* қарауға арналған амплификация шарттары

Сатысы	Амплификатор тұрпаты				
	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
Кезеңдер саны	40	40	40	40	40
Соңғы ұзарту	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С
Қату фазасы	1 мин/30	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4
Қыздыру жылдамдығы	1 °С/с	0,77 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	0,77 °С/с
Қату	1 °С/с	3,15°С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	3,15°С/с

2 Кесте — *nos* терминаторға арналған амплификация шарттары

Сатысы	Амплификатор тұрпаты				
	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
Кезеңдер	40	40	40	40	40
Соңғы	3 мин/72 °С	3 мин/72	3 мин/72 °С	3 мин/72	3 мин/72 °С
Қату фазасы	1 мин/30 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С
Қыздыру	1 °С/с	0,77 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	0,77 °С/с
Қату	1 °С/с	3,15°С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	3,15°С/с

7.4 ПЦР аяқталған соң әр шағынцентрифугалық түтіктен мұқият вазелин майының қабатынан 8 мм^3 қоспадан іріктейді және 6.1.12бойынша дайындалған гельді жеке қалтаға аударады.

7.5 Гельдің жеке қалтасына 8 мм^3 молекулярлық қоспаның маркерін масса ДНК 4.40, бойынша енгізеді[19].

7.6 Гельді 1- ТВЕ буферімен толтырылған көлденең электрофорезді жүргізу үшін 4.2 бойынша, [2] құрал камерасына салады.

Электрофорезді 65 мин. ішінде кернеу тұрақтану жағдайларында 6 В/см гельді электр тогы кернеу кезінде жүргізеді.

7.7 Электрофорезден кейін ПЦР өнімдерін көзбен шолуды 4.4, [4] бойынша видео жүйе көмегімен жүзеге асырады.

7.8 Файл-төлқұжат түрінде бірдейлендіру нәтижесі қатты магнитті тасымалдауышта сақталады және видеомониторға немесе принтерге шығарылады. Бейнелер үлгілері А және Б қосымшаларында келтірілген.

8 Талдау нәтижелерін өңдеу

8.1 Өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген құрамның стандартты үлгісінен бөлінген ГМИ [ДНК стандарты бар сынамада (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), *35S* қарауы бар] , өнім өлшемі ПЦР-боялған тілік болу тиіс, осы тілікті қалыптастыратын гель-электрофореграммада, 195 сыңар нуклеотидтерді құрайды (п.н.).

Өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген құрамның стандарттық үлгісінен бөлінген ГМИ [ДНК стандарт сынамасында және бос тәжірибеде боялған тілік болмау тиіс (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)] және гель-электрофореграммада осы тілікті қалыптастыратын ПЦР - өнімінің өлшемі 195 нуклеотидтер сыңарын құрады (п.н.).

8.2 Өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген құрамның стандарттық үлгісінен бөлінген ГМИ [ДНК стандарттарының сынамасында

(Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), терминаторы бар *nos*] боялған тілік болу тиіс, гель-электрофореграммада осы тілікті қалыптастыратын ПЦР- өнімінің өлшемі 180 п.н.құрады. Өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген құрамның стандарттық үлгісінен бөлінген ГМИ [ДНК стандарт сынамасында (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)] және бос тәжірибеде боялған тілік болмау тиіс, гель-электрофореграммада осы тілікті қалыптастыратын ПЦР- өнімінің өлшемі 180 п.н.құрады.

8.3 Нәтижелерді интерпретациялау

8.3.1Өлшемі 195 п.н. және 180 п.н. ПЦР-өнімінің талданатын сынамада жоқтығы талданатын өнімде генетикалық түрлендірілмеген көздер болуы туралы куәландырады.

8.3.2 Өлшемі 195 п.н. және 180 п.н. ПЦР-өнімінің немесе оның бірі талданатын сынамада болуы өнімде генетикалық түрлендірілген көздер болуы туралы куәландырады.

8.3.3 ПЦР-өнімінің сынамалары қосарлас талданатын сынамалардың бірінде болған және басқа қосарлас талданатын сынамаларда жоқ болған жағдайда талданатын өнімнің тағы бір ілмесін талдауды қайталау қажет.

8.3.4 ПЦР-продуктов өлшемі 195 п.н. және 180 п.н. ПЦР-өнімінің жағымсыз бақылауында болуын табу жағымсыз нәтижелері туралы куәландырады. Бұл ГМИ-мен жабдықтың және (немесе) реактивтердің кірлену кезінде мүмкін. Бұл жағдайда зертханалық үстелдердің және дозаторлардың беттерін тұз қышқылы ерітіндісімен (1 моль/дм^3) өңдеу, реактивтерді жаңа піскендерге ауыстыру, амплификацияны қайталау керек.

8.3.5 ПЦР-продуктов өлшемі 195 п.н. және 180 п.н. ПЦР-өнімдерін жағымды бақылау жоқтығы жағымсыз нәтижелерін алу туралы куәландырады. Бұл ПЦР арналған реакциялық қоспалар компоненттерінің бірі білсенділікті жоғалтқан кезде мүмкін. Бұл жағдайда жаңа дайындалған реактивтерге ауыстыру және амплификацияны қайталау керек.

9 Бірдейлендіру нәтижелерін бақылау

Бірдейлендіру нәтижелерін бақылауда өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген құрамның стандарттық үлгісінен бөлінген ДНК ерітіндісін – жағымды бақылауды (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), және өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген көздердің стандарттық үлгісінен (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)бөлінген ДНК ерітіндісін және бос тәжірибені екі жағымсыз бақылауды қолданылады.

10 талдау нәтижелерін рәсімдеу

Өнімдегі генетикалық түрлендірілген көздердің құрамын талдау нәтижелерін рәсімдеу үлгісі В қосымшасында келтірілген хаттамамен ресімделеді.

11 Қауіпсіздік талаптары

11.1 Жұмыстарды орындауда ГОСТ 12.1.007 бойынша химиялық реактивтермен жұмыс істеу кезінде қауіпсіздік талаптарын сақтау керек. Бромды этидий және боялған гель ерітіндісімен жұмыс істеу кезінде резеңке қолғаппен жұмыс істеу қажет.

11.2 Жұмыс жүргізілетін бөлмелер ГОСТ 12.4.021 бойынша кіру-сору желдеткішімен жабдықталуы тиіс. Жұмыс аумағы ауасындағы зиянды заттар құрамы ГОСТ 12.1.005 белгіленген нормалардан аспау керек.

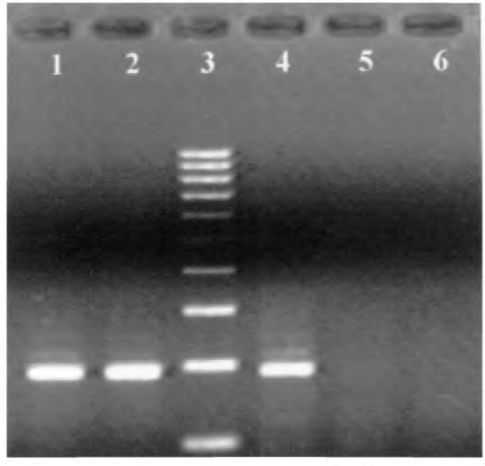
11.3 Электр қондырғылармен жұмыс істеу кезінде электр қауіпсіздік ГОСТ 12.1.019 талаптарына сәйкес. Зертхана бөлмелері ГОСТ 12.1.004 бойынша өрт қауіпсіздігі талаптарына сәйкес болу тиіс және ГОСТ 12.4.009 бойынша өрт сөндіру құралдары болу тиіс.

11.4 УФ-сәлеленумен жұмыс істеу кезінде қорғау экранын және қорғау көзілдіріктерін қолдану керек.

11.5 Бақылау кезінде қолданылатын қауіпті материалдармен және реактивтермен жұмыс істеу кезінде [28], сонымен қатар нормативтік құжаттармен ескерілген қауіпсіздік талаптарын сақтау керек.

А қосымшасы
(міндетті)

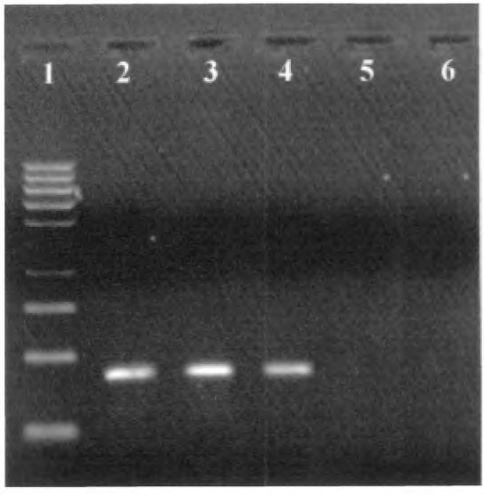
Генетикалық түрлендірілген көздерді бірдейлендіру үшін электрофорез нәтижелерін суретке тарту үлгісі: рекомбинантты ДНК (промотор *35S)*



1, 2 — талданатын сынамалар; 3 — молекулярлық масаның маркері 100 п.н.; 4— өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген құрамның стандарттық үлгісі; 5 — өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген құрамның стандарттық үлгісі; *6* — бос тәжірибе

Б қосымшасы
(міндетті)

Генетикалық түрлендірілген көздерді бірдейлендіру үшін электрофорез нәтижелерін суретке тарту үлгісі: рекомбинантты ДНК (терминатор *nos*)



1 — молекулярлық масаның маркері 100 п. н.; *2, 3* — талданатын сынамалар; *4* — өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген құрамның стандарттық үлгісі; *5* — өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілмеген құрамның стандарттық үлгісі; *6* — бос тәжірибе

В қосымшасы
(ұсынылатын)

Сынау хаттамаларын рәсімдеу үлгісі*

Өнім атауы (сынау зертханалары)
Сынау хаттамалары
№_____ «___»_____ 200__ж.

Күндері: сынауға түскен «___»_____200__ж.
Сынаулар соңы«___»_____200__ж.

Өнім: Жаңа піскен қызанақтар
Шикізатты немесе өнімді өндіруші «Туран» ЖШС.
Өнімді немесе шикізатты ұсыну «Ляззат» сауда үйі.
Сынамаларды іріктеу жүргізілді ҚР СТ Р ГОСТ 15810-2004
(тиісті біркелкі шикізат немесе өнім тобының нормативтік құжаттарына сәйкес)
Сынамаларды іріктеу актісі және сынауға техникалық тапсырма № 8 01.07.04 ж
Сынаулар ҚР СТ* талаптар негізінде жүргізілді.
Үлгі нөмірі 1/2004, 2/2004, 3/2004 и 4/2004
Сыналатын үлгінің сипаттамасы (таңбалау, түрі және орама жағдайы, заттаңба, сызықтау) –
Таңбалау –

_____дейін жарамды Сызықшалы коды _____.

Сынау нәтижелері

Үлгі нөмірі	Трансгенді тізбектілік	
	35S	*nos*
1/2004	жоқ	жоқ
2/2004	бар	жоқ
3/2004	жоқ	жоқ
4/2004	бар	бар

* Үлгі шарттық келтірілген

Талдау нәтижелері: 2/2004 және 4/2004 үлгілерде келесі трансгенді компоненттер табылды:

№ 2/2004 үлгіде *35S* промоторлар табылды;

№ 4/2004 үлгіде *35S* және *nos* табылды. № 2/2004 және 3/2004 үлгілерде трансгенді компоненттер табылмады. № 2/2004, 3/2004 және 4/2004 үлгілерде ГМИ өнімдері туралы хабарлайтын қаптамадағы таңбалау жоқ, ал № 1/2004 үлгіде бар.

Орындаушылар:

қолы тегі, аты-жөні

қолы тегі, аты-жөні

Сынау зертханалардың басшысы:

қолы тегі, аты-жөні

Тұжырымдама сынауға ұсынылған үлгіге таралады.

Қосымша
(анықтамалық)

Библиография

[1]	ТШ 9642-001-4648062-98	«Терцик МС-2» амплификатор
[2]	«Био-Рад зертханасы», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170-4406	Электрофорезге арналған камера«Mini Sub Cell GT System»
[3]	«Био-Рад зертханасы», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 900-7980	«Power Pac 300» Кернеу көзі
[4]	«Био-Рад зертханасы», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170-86-16	«Gel Doc 2000™ Gell Documentation System» видеожүйесі
[5]	ТШ 9452-007-18240041-00	Эппендорф «ТЭТА», 12000^{-1} тұрпатты үстел микроцентрифугасы
[6]	ТШ 9452-001-18240041-99	Термостат «TERMO 24-15»
[7]	ТШ 46-22-603-75	Электр немесе от жылытуымен су моншасы
[8]	ТШ 113-04-146-84	Этилендиаминтетра сірке қышқылы (ЭДТА)
[9]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № H 5882	Гексадецилтриметиламмониум бромиді [$C_{19}H_{42}NBr$]
[10]	ТШ 6-09-402-85	Изопропилен спирті [$CH_3CHOH\ CH_3$]
[11]	ССТ11.029.003-80	Иондалмаған су
[12]	ТШ6-09-4292-76	Трис (оксиметил) аминометан [$NH_2C(CH_2OH)_3$]
[13]	ТШ6-09-08-1024-81	2-меркаптоэтанол [C_2H_6OS]
[14]	ТШ 6-09-13-452-75	Бромды этидий [C_2]$H_{20}N_3Br$]

[15]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № B 4287	Бұқа сарысуының құрғақ альбумині
[16]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № Д 1806	Фермент Taq-полимераза
[17]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № P 2192	ПЦР бар буфер $MgCl_2$
[18]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № A 6877	Электрофорезге арналған агароза
[19]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № P 1473	ПЦР маркер 100 п.н.
[20]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Fluka»), кат. № 53198	Өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген көздердің стандарттық үлгісі (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)
[21]	К «Сигма Алдрич» Корпорациясы («Fluka»), кат. № 44386	Өсімдік текті тамаққа генетикалық түрлендірілген көздердің стандарттық үлгісі (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5)
[22]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № Д 4788	2'-дезоксиаденозин-5' трифосфор қышқылы тетранатрий тұзы, тригидрат (АТФ)
[23]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № Д 4913	2'-дезоксицитидин-5' трифосфор қышқылы тетранатрий тұзы, тригидрат (ЦТФ)

[24]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № Д 5038	2'-дезоксигуанозин-5' трифосфор қышқылы тетранатрий тұзы, тригидрат (ГТФ)
[25]	«Сигма Алдрич» Корпорациясы («Sigma»), кат. № Т 9656	2'-дезокситимидин-5' трифосфор қышқылы тетранатрий тұзы, тригидрат (ТТФ)
[26]	«Синтол» ЖАҚ Ресей (gost.e-ecolog.ru)	Промоторға праймерлер 35S: 35S-15'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3'; 35S-2 5'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'
[27]	«Синтол» ЖАҚ Ресей (http://www.syntol.ru)	Терминаторға праймерлер NOS: nos-15'GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3'; nos-25' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA3'
[28]	СЕ 1.2.006-93	Микроорганизмдермен жұмыс қауіпсіздігі жөніндегі санитарлық ережелер. 1 Бөлік.

ӘОЖ 663/664.001.4:006.354	МСЖ	МСЖ	МСЖС
	65.140	H11	C11-C13
	65.160	H13	C21
	67.060	H17	C23-C25
	67.080	H23	C32-C36
	67.100	H27	C41-C45
	67.120	H31-H36	C52
	67.140	H41-H43	
	67.140.30	H48	
	67.160.20	H51-H56	
	67.180.	H65	
	67.200.20	H68	
	67.220	H72	
	67.230	H74	
		H81	
		H97	

Түйінді сөздер: тамақ шикізаты, тамақ өнімдері, генетикалық түрлендірілген көздер, бірдейлендіру, тізбекті реакцияның полимеразды әдісі, рекомбинантты ДНК, промоторға арналған праймер, терминаторға арналған праймер

Ескертулер үшін



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Биологическая безопасность
Сырье и продукты пищевые

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОДИФИЦИРОВАННЫХИСТОЧНИКОВ(ГМИ) РАСТИТЕЛЬНОГОПРОИСХОЖДЕНИЯ

СТ РК 1346-2005
(ГОСТ Р 52173-2003, MOD)

Издание официальное

Комитет по техническому регулированию и метрологии
Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

Астана

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием « Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета по техническому регулированию и метрологии

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан от 1 сентября 2005 года № 237

3 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ **2010 год**
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ **5 лет**

4 Настоящий стандарт является модифицированным относительно ГОСТ Р 52173-2003 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников(ГМИ) растительного происхождения путем приведения использованной в ГОСТ Р 52173-2003 терминологии в соответствие с законом Республики Казахстан «О качестве и безопасности пищевых продуктов», а также частичного изменения структурных элементов стандарта и их содержания в соответствии с СТ РК 1.5-2004 Государственная система технического регулирования Республики Казахстан. Общие требования к построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов.

Указанные изменения по тексту выделены наклонным шрифтом и предусматривают возможность применения при испытаниях средств измерений и оборудования, а также реактивов и материалов, обеспечивающих аналогичные результаты испытаний и безопасность персонала

5 В настоящем стандарте реализованы нормы законов Республики Казахстан: «О техническом регулировании», «О здравоохранении в Республике Казахстан», «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», « О качестве и безопасности пищевых продуктов», «О защите прав потребителей».

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан

Содержание

1	Область применения	1
2	Нормативные ссылки	1
3	Термины, определения и сокращения	2
4	Аппаратура, материалы и реактивы	2
5	Отбор проб	5
6	Подготовка к проведению анализа	5
7	Проведение анализа	9
8	Обработка результатов анализа	11
9	Контрольрезультатовидентификации	12
10	Оформление результатов анализа	12
11	Требованиябезопасности	12
Приложение А	Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников : рекомбинантная ДНК (промотор 35S)	14
Приложение Б	Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников : рекомбинантная ДНК (терминатор nos)	15
Приложение В	Пример оформления протокола испытания	16
Приложение	Библиография	18

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ (ГМИ) РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Дата введения 2006.07.01.

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 ссылки на следующие стандарты

СТ РК* Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

СТ РК ГОСТ Р 51810-2004 Томаты свежие, реализуемые потребителям. Технические условия

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

ГОСТ 12.1.019-79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021-75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

Издание официальное

* Стандарт находится в разработке

ГОСТ 3118-77 Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 3164-78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия.

ГОСТ 4233-77 Натрий хлористый. Технические условия.

ГОСТ 4328-77 Натрия гидроокись. Технические условия.

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная Технические условия

ГОСТ 9656-75 Кислота борная. Технические условия.

ГОСТ 9805-84 Спирт изоприловый. Технические условия.

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 12738-77 Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия.

ГОСТ 14919-83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия.

ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Технические условия.

ГОСТ 21400-75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 26678-85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия.

ГОСТ Р 51652-2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют термины и определения в соответствии с *СТ РК**.

В дополнение к ним в настоящем стандарте применяется термин:

Генетически модифицированные источники пищи: Используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде пищевые продукты (компоненты), полученные из генетически модифицированных организмов.

3.2 В настоящем стандарте применяются следующие сокращения:

- ПЦР - полимеразная цепная реакция;

- БСА - альбумин бычий сывороточный сухой;

- ГМИ - генетически модифицированные источники.

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, с погрешностью ± 0,5 ^{0}С.

4.7 Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 12000 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 II) с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

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; 1000мм^3; 10см^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 Этилендиаминтетрауксуснаякислота (ЭДТА), х. ч. [8].

4.24 Гексадецилтриметиламмониумбромид [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 – 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'.

4.45 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристикамии оборудования с техническими характеристиками, аналогичными указанным выше, а также реактивов и материалов, используемых при испытаниях, обеспечивающих получение идентичных результатов контроля и безопасность персонала, занятого в проведении испытаний.

5 Отбор проб

Отбор проб проводят *по нормативным правовым актам в области технического регулирования,* стандартам и другим нормативным документам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевого сырья и пищевых продуктов.

6 Подготовкак проведениюанализа

6.1 Приготовление растворов

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

В мерную колбу по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см^3 помещают (12,11 ± 0,01) 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 холодильникепо ГОСТ 26678 при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

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

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (29,22± 0,01) г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в приблизительно80 см^3 деионизированнойводы, доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Срок хранения при температуреот 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.3 Приготовление раствора концентрацией *с* (NaOH) = 30 %.

В колбу по ГОСТ 1770 вместимостью50 см^3 помещают (3± 0,01) г гидроокиси натрия по ГОСТ 4328, растворяют в 7 см^3 деионизированной воды. Срок хранения при температуреот 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

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

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают (14,62± 0,01) г этилендиаминтетрауксуснойкислоты по 4.23, [8], растворяют в приблизительно80 см^3 деионизированной воды. Раствором гидроокиси натрия, приготовленным по 6.1.3, доводят pH раствора до 8,0, деионизированнойводой доводят до метки и перемешивают.

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

6.1.5 Приготовлениелизирующегобуфера

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью25 см^3 помещают (0,5±0,001) г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 10 см^3 деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором2,5 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±0,1) $см^3$ 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 ±0,1) $см^3$ 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 *с* (БСА) = 20 *мкг*/$см^3$

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 $см^3$ помещают (0,002±0,01) $см^3$ 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±0,1) $мм^3$ деионизированной воды, (1 ±0,01) $мм^3$ АТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43, [22], (1 ±0,01) $мм^3$ ГТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43, [24], (1 ±0,01) $мм^3$ ЦТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43, [23], (1 ±0,01) $мм^3$ 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 ±0,01) г Трис (оксиметил) аминометана, 5,5 г борной кислоты по ГОСТ 9656 и (0,92 ±0,01) 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±0,01) 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±0,01) 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 (12000-13000) 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 12000 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 12000 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 12000 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 ±0,1) см^3, помещенную в кювету со льдом, вносят (312,5 ±0,1) мм^3 деионизированной воды, 52,5 мм^3 10·буфера для ПЦР с хлоридом магния по 4.38, [17], (26±0,1) мм^3 смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9,

(13 ±0,1) мм^3 праймера на промотор *35S*-1 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.44, [26], (13 ±0,1) мм^3 праймера на промотор *35S*-2 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.44, [26], (2,5±0,1) мм^3 фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм^3) по 4.37, [16], (52,5 ±0,1) 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 6.2.1.1—6.2.1.7, 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	3 мин/94 °С	3 мин/95 °С	2 мин/96	3 мин/94
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·ТВЕ.

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.

8.3.3В 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. свидетельствуето получении ложноположительногорезультата 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.

8.3.5Отсутствие в положительномконтроле ПЦР-продуктов размером 195 п.н. и 180 п.н. свидетельствуето получении ложноотрицательногорезультата 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 Контрольрезультатовидентификации

Для контроля результатовидентификацииисполь зуютположительныйконтроль — 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 Оформление результатов анализа

Результаты анализа на содержание в продукции генетически модифицированных источников оформляются протоколом, пример оформления, которого приведен в приложении В.

11 Требованиябезопасности

11.1 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.

11.2 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.

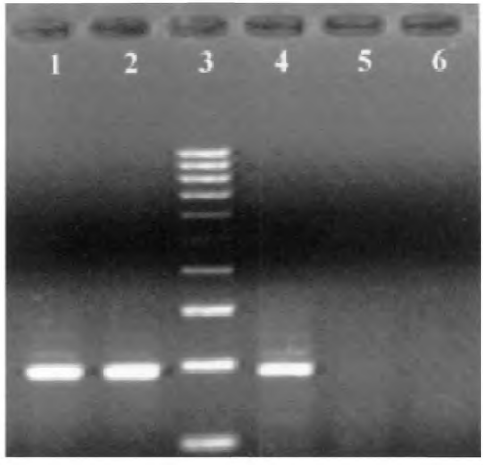
11.3 При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.019. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

11.4 При работе с УФ-излучением необходимо пользоваться защитным экраном и защитными очками.

11.5 При работе с опасными материалами и реактивами, используемыми при контроле следует соблюдать требования безопасности, предусмотренные [28], а также нормативными документами на них.

Приложение А
(обязательное)

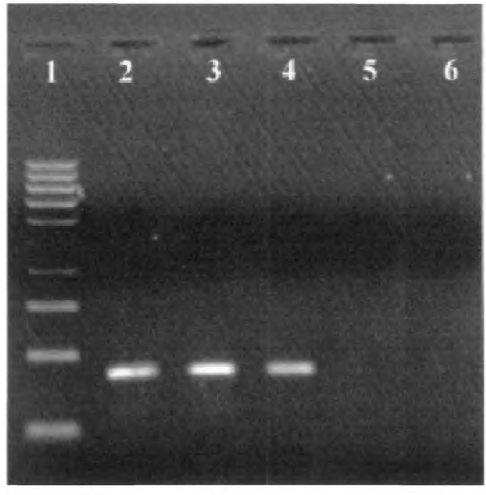
Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (промотор *35S)*



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

Приложение В
(рекомендуемое)

Пример оформления протокола испытания*

Наименованиеорганизации(испытательнаялаборатория)
Протокол испытаний
№_____от «___»_____ 200__ г.

Даты: поступления на испытание «___»_____200__г.
конца испытаний «___»_____200__г.

Продукция: Томаты свежие

Производитель сырья или продукции _____ТОО «Туран»

Предъявитель сырья или продукции _____торговыйдом «Ляззат»_____.
Отбор проб произведен _____СТ РК ГОСТ Р 15810-2004

(в соответствии с нормативным документом на соответствующую однородную группу сырья или продукции)
Акт отбора проб и техническое задание на испытания № 8 от 01.07.2004 г.
Испытания проведены на основании требований СТ РК* -.
Номер образца _____1/2004, 2/2004, 3/2004 и 4/2004 .
Характеристика испытуемого образца (маркировка, вид и состояние упаковки, этикетки, штриховка) ___–

Маркировка _____–

Годен до _____ Штриховой код _____.

Результаты испытаний

Номер образца	Трансгенные последовательности	
	35S	*nos*
1/2004	Отсутствует	Отсутствует
2/2004	Присутствует	Отсутствует
3/2004	Отсутствует	Отсутствует
4/2004	Присутствует	Присутствует

* Пример приведен условно

Результат анализа: В образцах 2/2004 и 4/2004 обнаружены следующие трансгенные компоненты:

в образце № 2/2004 обнаружены промоторы *35S;*

в образце № 4/2004 обнаружены промоторы *35S* и *nos.* В образцах № 2/2004 и 3/2004 трансгенные компоненты не обнаружены. Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ в образцах № 2/2004, 3/2004 и 4/2004 отсутствует, а в образце № 1/2004 присутствует_____

Исполнители

подпись фамилия, инициалы

подпись фамилия, инициалы

Руководитель испытательной лаборатории

подпись фамилия, инициалы

Заключение распространяется на образец представленный на испытания

Приложение
(справочное)

Библиография

[1]	ТУ 9642-001-4648062-98	Амплификатор «ТерцикМС-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™ Gell Documentation System»
[5]	ТУ 9452-007-18240041-00	Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф «ТЭТА», 12000 g
[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. № Н 5882	Гексадецилтриметиламмоний бромид [$C_{19}H_{42}NBr$]
[10]	ТУ 6-09-402-85	Спирт изопропиловый [$CH_3CHOHCH_3$]
[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_6OS]
[14]	ТУ 6-09-13-452-75	Этидий бромистый [$C_{21}H_{20}N_3Br$]
[15]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma») кат. № В 4287	Альбумин бычий сывороточный сухой
[16]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma») кат. № Д 1806	Фермент Taq-полимераза
[17]	Корпорация «Сигма Алдрич»	Буфер для ПЦР с $MgCl_2$

	(«Sigma»)кат. № Р 2192	
[18]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Sigma»)кат. № А 6877	Агарозадляэлектрофореза
[19]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Sigma»)кат. № Р 1473	ПЦРмаркер100п.н.
[20]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Fluka»)кат. № 53198	Стандартныйобразецсоставагенетическимодифицированногоисточникапищирастительного происхождения(Certified Reference Material IRMM№ 410R SB-0)
[21]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Fluka»)кат. № 44386	Стандартныйобразецсоставагенетическимодифицированногоисточникапищирастительного происхождения(Certified Reference Material IRMM№ 410R SB-5)
[22]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Sigma»)кат. № Д 4788	2'-дезоксиаденозин-5'трифосфорнойкислотытетранатриеваясоль, тригидрат(АТФ)
[23]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Sigma»)кат. № Д 4913	2'-дезоксицитидин-5'трифосфорнойкислотытетранатриеваясоль, тригидрат(ЦТФ)
[24]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Sigma»)кат. № Д 5038	2'-дезоксигуанозин-5'трифосфорнойкислотытетранатриеваясоль, тригидрат(ГТФ)
[25]	Корпорация«СигмаАлдрич» («Sigma»)кат. № Т 9656	2'-дезокситимидин-5'трифосфорнойкислотытетранатриеваясоль, тригидрат(ТТФ)
[26]	ЗАО «Синтол» Россия (http://www.syntol.ru)	Праймерыпромотор*35S: 35S*-1 5'GCTCCT ACA AAT GCC ATC A 3';*35S*-2 5'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'
[27]	ЗАО «Синтол» Россия (http://www.syntol.ru)	ПраймерытерминаторNOS:*nos*-15'GAATCC TGT TGC CGG TCT TG 3',*nos*-25' TTA TCC TAG TTT GCG CGCTA3'
[28]	*СП 1.2.006-93*	*Санитарныеправилапо безопасностиработес микроорганизмами.Часть 1.*

УДК 663/664.001.4:006.354	МКС	КГС	КГС
	65.140	H11	C11-C13
	65.160	H13	C21
	67.060	H17	C23-C25
	67.080	H23	C32-C36
	67.100	H27	C41-C45
	67.120	H31-H36	C52
	67.140	H41-H43	
	67.140.3	H48	
	67.160.2	H51-H56	
	67.180	H65	
	67.200.2	H68	
	67.220	H72	
	67.230	H74	
		H81	
		H97	

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

gost.e-ecolog.ru