ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК СТАНДАРТЫ

Биологиялық қауіпсіздік
Шикізат және тамақ өнімдері

БИОЛОГИЯЛЫҚ МИКРОЧИПТІ ҚОЛДАНЫЛЫП ӨСІМДІК ТЕКТІ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТҮРЛЕНДІРІЛГЕН КӨЗДЕРДІ (ГТК) БІРДЕЙЛЕНДІРУ ӘДІСІ

ҚР СТ 1345-2005
(Р ГОСТ 52174-2003, 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 52174-2003 қолданылған терминологияны келтіру, сонымен қатар ҚР СТ 1.5-2004 Қазақстан Республикасының мемлекеттік техникалық реттеу жүйесі. Стандарттардың құрылуына, баяндалуына, ресімделуіне және мазмұнына қойылатын жалпы талаптарға сәйкес стандарт бөлімінің мазмұнын және құрылымын ішінара өзгерту жолымен, Р ГОСТ 52174-2003 Биологиялық қауіпсіздік. Шикізат және тамақ өнімдері. Биологиялық микрочипті қолданып өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру әдісі, MOD" (2005 жылы жарияланған түзетумен) нормаларына және талаптарына қатысты түрлендірілген.

Мәтін бойынша көрсетілген өзгертулер көлбеу қаріппен белгіленген және сынау кезінде өлшеу құралдары мен жабдықтарды, сонымен қатар ұқсас сынау нәтижелерін және персонал қауіпсіздігін қамтамасыз еметін реактивтер мен материалдарды қолдану мүмкіндігін ескереді.

5 Осы стандартта: «Қазақстан Республикасында денсаулық сақтау туралы», «Халықтың санитарлық-эпидемиологиялық саулығы туралы», «Тамақ өнімдерінің сапасы және қауіпсіздігі туралы», «Тұтынушылардың құқықтарын қорғау туралы», «Техникалық реттеу туралы» Қазақстан Республикасы Заңдарының нормалары 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

БИОЛОГИЯЛЫҚ МИКРОЧИПТІ ҚОЛДАНЫЛЫП ӨСІМДІК ТЕКТІ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТҮРЛЕНДІРІЛГЕН КӨЗДЕРДІ (ГТК) БІРДЕЙЛЕНДІРУ ӘДІСІ

Енгізілген күні 2006-07-01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт тамақ шикізатына (соның ішінде егетін және отырғызатын материал), тамақ өнімдеріне, гүлдерге (бұдан әрі қарай — өнім) таралады және биологиялық микрочипті қолданылып өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру әдісін белгілейді.

Әдіс биологиялық микрочипте осы амПЦР өнімдерін әрі қарай гибридизациялап, асимметриялық мультиплексті полимеразды тізбекті реакциясында (бұдан әрі қарай — амПЦР) негізделген. Әдіс бір уақытта талданатын сынаманда ДНК-ның түрлі трансгенді тізбектерінің бестен кем емесі болуын немесе жоқтығын белгілейді. Әдістің сезімталдығы -10^{-12} г (1 пг) ДНК кем емес.

2 Нормативтік сілтемелер

Осы стандартта келесі стандарттарға сілтемелер пайдаланылған:

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.

Ресми басылым

ГОСТ 12.4.021-75 Еңбек қауіпсіздігінің 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 гидро тотығы. Техникалық шарттар.

ГОСТ 6709-72 Тазартылған су. Техникалық шарттар.

ГОСТ 9284-75 Микропрепараттарға арналған заттық шынылар. 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 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 29227-91 (ИСО 835-1—81) Зертханалық шыны ыдыстар. Градуирленген тамызғыштар. 1 Бөлік. Жалпы талаптар.

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

3 Терминдер, анықтамалар және қысқартулар

3.1 Осы стандартта тиісті анықтамаларымен келесі терминдер қолданылады:

3.1.1 **Биологиялық қауіпсіздік:** Адамның, қоғамның және қоршаған ортаның уытты, аллергенді, канцерогенді, мутагенді биологиялық заттарының және табиғи- немесе генді-инженерлік- түрлендірілген биологиялық объектілерінде және олардан алынған өнімдерде бар қоспалардың жағымсыз әсерінен қорғалуы.

3.1.2 ***Генетикалық түрлендірілген көздер:*** *Генді инженерлік әдістерді қолданып алынған өсімдік және (немесе) мал текті шикізаттар мен өнімдер [1]*

3.1.3 ***Генетикалық түрлендірілген организм:*** *Табиғи организмдерден айырмашылығы бар, гендік инженерия әдістерін қолданып алынған және құрамында гендік-инженерия материалы (гендер, олардың фрагменттері,*

немесе жеке гендер құрамдастырымы) бар, гендік материалды қайталауға немесе тапсыруға қабілеті бар организм бірнеше организмдер, кез келген клеткалы емес, бір клеткалы немесе көп клеткалы пайда болулар [1].

3.1.4 **Гендік инженерия:** Қабылдаулар, әдістер және технологиялар жиынтығы, организмдерден гендердің бөлінуі, геналармен манипуляцияларды жүзеге асыру және оларды басқа организмдерге енгізу бойынша рекомбинантты нуклеин қышқылдарын алу технологияларының жиынтығы.

3.1.5 **Биологиялық микрочип:** Олигонуклеотидтер жинағы иммобилизденген ұялары бар микроматрица.

3.1.6 **Праймер:** Асимметриялық мультиплексті полимеразды тізбекті реакциясын жүргізу үшін қолданылған ұзындығы 25 нуклеотидтерге дейін бір тартымды ДНК тізбектілігі.

3.1.7 **Асимметриялық мультиплексті полимеразды тізбекті реакция:** Полимеразді тізбекті реакция, онда бір түтікте бірнеше праймерлер қатысуымен бір уақытта талданатын ДНК түрлі тізбектілігі амплифицирленеді, сонымен әр сыңар праймері бірінің мөлшері басқа праймер мөлшерінен асады.

3.2 Осы стандарта келесі қысқартулар қолданылады:

3.2.1 ***амПЦР*** *- асимметриялы мультиплексті полимеразды тізбекті реакциясы.*

3.2.2 ***ГТК*** *- генетикалық түрлендірілген көздер.*

4 Аппаратуралар, материалдар және реактивтер

4.1 “Чипдетектора-03” көмегімен алынған бейнелерді талдауға арналған “Imageware” компьютерлік бағдарлама [2] немесе “Био-1” [25].

4.2 “Чипдетектор-03” тұрпатты биологиялық микрочиптердің флуоресценцияларын талдауға арналған аппаратты-бағдарламалық кешені [3] немесе “Евробио-ВТО” [26].

4.3 Сыйымдылығы 0,2, 0,5 $см^3$ белсенді элементтің қызығу (салқындату) жылдамдығы 1,5 °С/с кем емес микроцентрифугалы түтіктер астына “Терцик МС-2” тұрпатты ДНК амплификаторы [4].

4.4 Жұмыс температурасы 37 °С, жұмыс ауқымы 20 °С дан 60 °С дейін, ұстау температурасы +1 °С ТВЗ-25 тұрпатты құрғақ ауа термостаты [5].

4.5 Бір рет өлшеудің рауалы абсолютті қателігінің шегі +0,0001 г көп емес дәлдіктің жоғары сыныбының жалпыға арналған зертханалық таразылары (шарттық белгісі (II)) ГОСТ 24104 бойынша.

4.6 ±0,5 ^{0}С рауалы қателікпен минус 20 °С температураны қамтамасыз ететін мұздатқыш камера ГОСТ 26678 бойынша.

4.7 Тұрмыстық электр тоңазытқыш ГОСТ 26678 бойынша.

4.8 Айналым жиілігі 13000 мин$^{-1}$ кем емес 5415С тұрпатты үстел микроцентрифугасы[6].

4.9 Жылытатын магнитті былғауыш [7].

4.10 Айналым жиілігі 1500 мин$^{-1}$ кем емес CV – 1500 тұрпатты сілкуге арналған аппарат [8].

4.11 Өлшеу қателігі ± 0,1 pH электродтар жинағы бар pH-метр.

4.12 Мөлшерлеудің ауыспалы көлемі бар микродозаторлар: (0,5-10,0) мм^3 [қадам - 0,1 мм^3, дәлдігі ± (2,5-10,0) %, қайталанушылығы (3-7) %]; (5,0-50,0) мм^3 [қадам - 0,5 мм^3, дәлдік ± (2,0%-5,0) %, қайталанушылығы (2,5-5)%]; (20,0-200,0) мм^3 [қадам - 1,0 мм^3, дәлдік ± (1,5-2,0)%, қайталанушылығы (2-3)%]; (100-1000) мм^3 [қадам - 5 мм^3, дәлдік ± (1,0-1,5) %, қайталанушылығы (1-2) %].

4.13 RP-30 және RP-80 тұрпатты микроцентрифугалы түтіктер астына штативтер 30 және 80 дана. [9].

4.14 10; 20; 200; 1000 мм^3 дейін сұйықтықтарды мөлшерлеудің ауыспалы көлемімен микродозаторларға (микропипеткаларға) арналған сүзгіші бар ұш [10].

4.15 Эппендорф сыйымдылығы 0,2; 0,5 және 1,5 см^3 зарарсыздандырған “Эппендорф” тұрпатты микроцентрифугалы түтік.

4.16 сыйымдылығы 1,5 см^3 микро центрифугалы түтіктерге арналған былғауыш немесе таяқша ГОСТ 21400 бойынша.

4.17 Шыны өлшеуіш зертханалық цилиндрлер ГОСТ 1770 бойынша 25, 100, 250 және 1000 см^3.

4.18 сыйымдылығы (50-1000) см^3 шыны өлшеуіш жалпақ табанды коникалық колбалар ГОСТ 25336 бойынша.

4.19 Градуирленген шыны пипеткалар ГОСТ 29227 бойынша.

4.20 Зертханалық сүзгіш қағаз ГОСТ 12026 бойынша.

4.21 Натрий гидро тотығы ГОСТ 4328 бойынша.

4.22 Маңыздандырылған тұз қышқылы ГОСТ 3118 бойынша, х.ч.

4.23 Хлорлы натрий ГОСТ 4233 бойынша, х.ч.

4.24 Этилендиаминтетра сірке қышқылы динатрийлі тұз дигидрат (ЭДТА) [11].

4.25 Трис (оксиметил) аминометан [12].

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

4.27 Изопропилен спирті ГОСТ 9805 бойынша, х.ч.

4.28 Натрий додецилсульфат (SDS) [13].

4.29 Тазартылған су ГОСТ 6709 бойынша.

4.30 Құрамында ДНК, РНК және дезоксирибонуклеаз жоқ зарарсыздандырылған ерекше таза су.

4.31 Термотұрақты фермент Taq - полимераза, (70-72)°С-тағы белсенділік оптимумы [14].

4.32 ПЦР он мәртелік буфер (10х; 12,1 г 1 $дм^3$ –де Трис-HCl, pH 8,8; 37,28 г 1 $дм^3$ –де КС1, 5 % Твин-20, 50 % формамид; 142,83 мг 1 $дм^3$ –де $MgCl_2$).

4.33 Гуанидин тиоцианат [15].

4.34 N-[2-оксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфон қышқылы] (HEPES) [16].

4.35 Медициналық вазелин майы ГОСТ 3164 бойынша.

4.36 Дезоксирибонуклеозидтрифосфаттардың су ерітіндісі: дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ әр қайсысының концентрациясы 25 мМ [17].

4.37 Алдын ала трансгенді ерітінді ДНК (100 нг/$мм^3$ немесе 10^6 копий/$мм^3$ шамасында) [18].

4.38 Алдын ала трансгенді емес ерітінді ДНК (100 нг/$мм^3$ немесе 10^6 копий/$мм^3$ шамасында) [19].

4.39 Су моншасы [20].

4.40 Праймерлердің келесі буларын қамтитын геноманың тиісті телімдерін амплификациялау үшін "ПР-1" праймерлердің су ерітіндісі:

- гүлді қырыққабат мозаикасын вирусының *35S* қарау праймері:

*35S*_п 5′ CCT CCT CGG ATT CCA TTG CCC AG (23 н.о.)

*35S*_оф 5′ GTC CAT CTT TGG GAC CAC TGT CGG (24 н.о.)

gus бактериядан маркерлі генге праймерлер *Escherichia coli:*

*gus*_п 5′ AAG CCG GGC AAT TGC TGT GCC A (22 н.о.)

*gus*_оф 5′ GAC CGC ATC GAA ACG CAG CAC G (22 н.о.)

Agrobacterium tumefaciens агробактериядан *nos* қарауға праймерлер*:*

*nos*_п 5′ CGA TGA CGC GGG ACA AGC CGT (21 н.о.)

*nos*_оф 5′ GAC CTT AGG CGA CTT TTG AAC GCG C (25 н.о.)

бактериалды тектіТп5 транспазонның *nptII* маркерлі генге праймерлер:

*npt*_п 5′ GTG TTC CGG CTG TCA GCG CAG G (22 н.о.)

*npt*_оф 5′ CGC AAG GAA CGC CCG TCG TGG (21 н.о.)

Agrobacterium tumefaciens анробактериядан *ocs* терминаторға праймерлер*:*

*ocs*_п 5′ GCG AGA CGC CTA TGA TCG CAT GAT (24 н.о.)

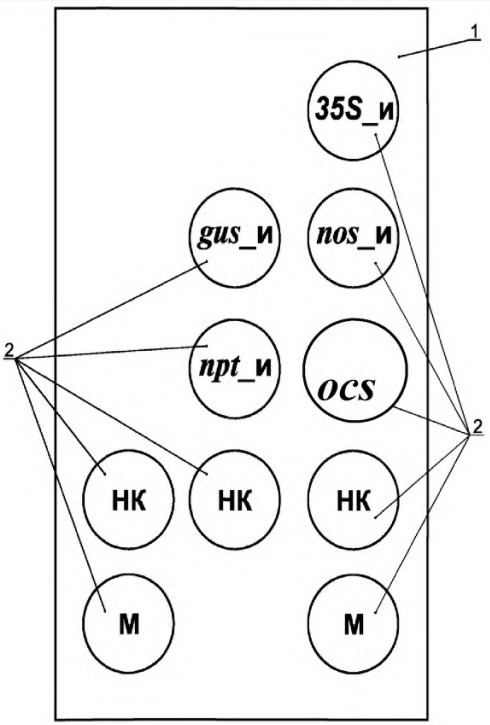
*ocs*_оф 5′ GAA ACC GGC GGT AAG GAT CTG AGC (24 н.о.)

Ескерту — "_п" индексінің праймерлер белгісінде "тік", индекс "_оф" белгілейді "кері флуоресценттi белгіленген"; н.о. — нуклеотидті қалдықтар [21].

4.41 1 кестеде келтірілген иммобилизацияланған олигонуклеотидтармен биологиялық микрочип [22]:

1 Кесте— Биологиялық микрочипте иммобилизацияланған олигонуклеотидтар

Олигонуклеотид атауы	Детектіленетін нысана	Олигонуклеотид тізбектілігі
*35S*_және	Промотор *35S*	5' GCC ATC ATT GCG ATA AAG
*gus*_және	Ген *gus*	5' CTG GTA TCA GCG CGA A
*nos*_және	Промотор *nos*	5' GCT AAG CAC ATA CGT CAG
*npt*_және	Ген *nptII*	5' GGC AGC GCG GCT ATC
*ocs*_және	Терминатор *ocs*	5' TTC TGT TGT GCA CGT TGT
Ескерту — "_және" индексі "иммобилизацияланған" көрсетеді.		



1 - заттық шыны
2 - гель ұясы

1 Сурет – өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру үшін биологиялық микрочип сұлбасы

4.41.1 Биологиялық микрочип полиакриламид гелімен толтырылған бетінде 10 микроскопиялық ұялар белгіленген тәртіпте орналасқан жарық микроспиясына арналған ГОСТ 9284 бойынша стандарттық заттық шыныны көрсетеді. Жоғарғы ұялардың бесінен бірінде жеке ковалентно иммобилизияланған олигонуклеотид бар (*35S, gus, nos, npt* немесе *ocs)*. "НК" индексі бар үш ұяда бұрын атап өтілген және жеке ковалентті иммобилизияланған олигонуклеотидтар бар және гибридизациялаудың жағымсыз бақылау ролін орындайды. "М" индексі бар екі ұяда ковалентті байланыстырылған флуоресцентті бояғышы бар және биологиялық микрочиптің бір мәнді бағдарына арналған. Ұясы бар биологиялық микрочиптің беті тесігі бар пластик қақпақпен жабылуы тиіс, ол заттық әйнекпен бірге талданатын сынамаға гибридизациялау жүргізуге арналған тұйық кеңістікті құрады.

4.42 Өлшеу ауқымы 24 сағат және ±5 с дәлелдігімен сағат.

4.43 Жоғарыда көрсетілгендерге ұқсас техникалық сипаттамалары бар басқа өлшеу құралдарын, сонымен қатар ұқсас бақылау нәтижелерін және сынау жүргізумен айналысатын персонал қауіпсіздігін алуды қамтамасыз ететін, сынау кезінде қолданылатын реактивтер мен материалдарды қолдануға рұқсат етіледі.

5 Сынамаларды таңдау

Сынамаларды таңдауды тамақ шикізатының (соның ішінде егетін және отырғызатын материалды), тамақ өнімдерінің, гүлдердің біркелкі топтарына сынамаларды іріктеу тәртібін белгілейтін *техникалық реттеу саласындағы нормативтік құқықтық актілер, стандарттар және басқа нормативтік құжаттар бойынша жүргізіледі.*

6 Талдау жүргізуге дайындау

6.1 Ерітінділерді дайындау

6.1.1 Концентрациясы 40 г/дм^3 NaOH ерітіндіні дайындау

Сыйымдылығы 100 см^3 шыны табаны жалпақ колбаға ГОСТ 1770 бойынша (4,0±0,01) г құрғақ натрий гидрототығын ГОСТ 4328 бойынша салады және 4.30 бойынша ерекше таза зарарсыздандырған суда100 см^3 ерітеді. Бөлме температурасына дейін ерітіндіні салқындатудан кейін оны арнайы сілтіге төзімді пластик тығыз жабылатын ыдысқа құяды. Сақтау мерзімі бөлме температурасында — бір жылдан көп емес.

6.1.2 Концентрациясы 186,12 г/дм^3 ЭДТА ерітіндісін дайындау

Сыйымдылығы 100 см^3 шыны түбі жалпақ колбаға (18,61±0,01) г ЭДТА 4.24 бойынша салады, магнитті араластырғышта [7] қарқынды араластыру кезінде ерекше таза зарарсыздандырған суда 80 см^3 ерітеді. Сосын натрий

гиррототығы ерітіндісін 6.1.1 бойынша 8,0 дейін pH ерітіндісін жеткізеді. Алынған ерітіндіні сыйымдылығы 100 $см^3$ өлшеуіш колбаға ГОСТ 12738 бойынша және ерекше таза зарарсыздандырған суды құяды және белгіге дейін осы ерітінді көлемін жеткізеді. Тоңазытқышта сақтау мерзімі ГОСТ 26678 бойынша (4-5) °С температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.3 70 %-ды этил спиртін дайындау

Сыйымдылығы 200 $см^3$ өлшеуіш колбаға ГОСТ 12738 бойынша жоғары дәрежеде тазаланған 140 $см^3$ 96 %-ды этил спиртін ГОСТ Р 51652 бойынша енгізеді, 52 $см^3$ ерекше тазаланған зарарсыздандырған суды қосады және араластырады. Сақтау мерзімі (4-5) °С температурада — 6 айдан көп емес.

6.1.4 Гибридизациялық буферді дайындау

Сыйымдылығы (300-500) $см^3$ шыны стаканға немесе түбі жалпақ колбаға дәл өлшенген мөлшерін салады: (44,33 ±0,01) г тиоцианат гуанидинін — 4.33 бойынша [15], (4,88±0,01) г N-[2-гидроксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфон қышқылын] натрийлі тұзды (HEPES) 4.34 бойынша[16]. Сосын сыйымдылығы 5 $см^3$ шыны тамызғышпен ГОСТ 29227 бойынша 6.1.2 бойынша дайындалған ЭДТА ерітіндісін 3,75 (±0,05) $см^3$ құяды, және сыйымдылығы 250 $см^3$ цилиндрмен ерекше таза зарарсыздандырған суды 200 $см^3$ қосады. Ерітіндісі бар стаканды 4.9 [7] бойынша магнитті былғауышпен араластырады және компоненттерді толық ерігенше араластырады. pH буфер мәнін 6.1.1 бойынша дайындалған натрий гидротығы ерітіндісін (7,5±0,1) дейін жеткізеді. Алынған ерітіндіні стаканнан сыйымдылығы 250 $см^3$ өлшеуіш колбаға аударады, ерекше таза зарарсыздандырған судың белгісіне дейін жеткізеді және 50 $см^3$ нан тығындары желінген түбі жалпақ колбаға құяды. Сақтау мерзімі (2-8) °С температурада — 12 айдан көп емес.

6.1.5 Трис-HCl концентрациясы 242,2 г/$дм^3$ ерітіндіні дайындау. Сыйымдылығы В 100 $см^3$ колбаға (24,22±0,01) г Трис (оксиметил) аминометанды 4.25 [12] бойынша салады және 80 $см^3$ ерекше таза зарарасыздандырылған суда ерітеді. Маңыздандырылған тұз қышқылында ГОСТ 3118 бойынша pH ерітіндіні 7,5 дейін, ал көлемін — 100 $см^3$ дейін ерекше таза зарарсыздандырған сумен жеткізеді. Сақтау мерзімі бөлме температурасында — 6 айдан көп емес.

6.1.6 Концентрациясы 146,2 г/$дм^3$ NaCl ерітіндіні дайындау

Сыйымдылығы 100 $см^3$ түбі жалпақ колбаға (14,62±0,1) г хлорлы натрийді ГОСТ 4233 бойынша араластырады, (70-80) $см^3$ ерекше таза зарарасыздандырылған суда ерітеді, сосын алынған ерітіндіні сиымдылығы 100 $см^3$ өлшеуіш колбаға аударады және и ерекше таза зарарасыздандырылған сумен белгіге дейін жеткізеді. Бөлме температурасындағы сақтау мерзімі — бір жылдан көп емес.

6.1.7 20 %-ды натрий додецилсульфат ерітіндісін дайындау (SDS) [13]

Сыйымдылығы 100 $см^3$ шыны колбаға (20 ±0,1) г құрғақ натрий додецилсульфатын салады 4.27 бойынша және 80 $см^3$ ерекше таза зарарсыздандырылған суды қосады. Магнитті араластырғышта бір қалыпты араластырған және (40-50) °С температураға дейін бір уақытта қызығу кезінде толық ерігенге дейін ерітеді. Бөлме температурасындағы сақтау мерзімі — бір жылдан көп емес.

6.1.8 Экстракция буферін дайындау

Сыйымдылығы 50 $см^3$ өлшеуіш колбада 6.1.5, 5 $см^3$ бойынша дайындалған Трис-HCl, ерітіндісінің (5±0,01) $см^3$, 6.1.6 бойынша дайындалған NaCl ерітіндісінің 5 $см^3$, 6.1.7 бойынша дайындалған 20 %-ды SDS (1,25±0,01) $см^3$ ерітіндісін, 6.1.2 бойынша дайындалған ЭДТА ерітіндісінің (2,5 0,01) $см^3$ араластырады; әр ерітіндіні шыны тамызғышпен іріктейді. Ерітінді көлемін 50 $см^3$ дейін ерекше таза зарарсыздандырған сумен жеткізеді. (4-5) °С температурада сақтау мерзімі — екі аптадан көп емес, мұздатқыш камерада ГОСТ 26678 бойынша минус 20 °С температурада — бір жылдан көп емес.

6.1.9 Taq-полимераза ерітіндісін 4.31 бойынша минус 20 °С температурада бір жылдан көп емес сақтайды. Taq – полимераза ерітіндісін минус 23 °С температурадан төмен емес сақтауға болмайды .

6.2 Талдауға арналған сынамаларды дайындау (ДНК бөлінуі)

6.2.1Салмағы (60-80) мг әр талданатын өнімді ілу үшін 4.15 бойынша сыйымдылығы 1,5 $см^3$, екі таза зарарсыздандырыдған микроцентрифугаға (15-20) ішінде былғауышмен біркелкі қоспаға дейін ГОСТ 21400 бойынша бөлме температурасында жеткізеді және дереу микро дозатормен 400 $мм^3$ – ден 6.1.8 бойынша дайындалған экстракция буферін қосады.

6.2.2 6.2.1 бойынша дайындалған қоспасы бар микроцентрифугалы түтікті сілкуге арналған аппаратта 5 с ішінде сілкиді 4.10 [8] бойынша, су моншасында [20] 65 °С дейін температурада тез қызытады және осы температурада (15-20) мин қоспаны мұқият араластырып ұстайды.

6.2.3 6.2.2 бойынша дайындалған қоспасы бар микро центрифугалы түтікті бөлме температурасында үстел центрифугада 4.8 бойынша [6] 5 мин. ішінде 13000 $мин^{-1}$ айналым жиілігінде центрифугалайды.

6.2.3 бойынша алынған тұнба бетіндегі сұйықтықты (300± 1) $мм^3$ бойынша іріктейді және құрамында 300 $мм^3$ –ден изопропил спирті бар таза микроцентрифугаға ГОСТ 9805 бойынша аударады. Құрамды араластырады, бөлме температурасында 5 мин ұстайды және 5 мин. ішінде 13000 $мин^{-1}$ айналым жиілігінде центрифугалайды.

---

*амПЦР арналған реакциялық қоспаны тікелей талдау алдында 20 °С жоғары емес температурада дайындайды.

**Taq-полимеразаның сақтау мерзімі 2 °С ден 8 °С дейін температурада араластырғаннан кейін — 2 с көп емес.

6.2.4 6.2.4 бойынша тұнба бетіндегі сұйықтықты микродозатормен мұқият жояды, 6.2.4 бойынша дайындаған ДНК тұнбасын 6.1.3 бойынша дайындалған, (0-4) °С температураға дейін салқындатылған 70 %-ды этил спиртінде 1 $см^3$ жуады, 6.2.4 ұқсас центрифугалайды. Алынған тұнба бетіндегі сұйықтықты қайтадан жояды ДНК тұнбасын этил спирті толық кеткенше бөлме температурасында, бірақ 30 мин.көп емес кептіреді.

6.2.5 6.2.5 бойынша алынған ДНК тұнбасын (40-50) $мм^3$ ерекше таза зарарсыздандырған суда қайта ерітеді. ДНК алынған ерітіндіні амПЦР жүргізу үшін қолданылады. ДНК ерітіндісінің сақтау мерзімі минус 20 °С температурада — бір жылдан көп емес.

6.3 Асимметриялық мультиплексті ПЦР дайындау

6.3.1 амПЦР* арналған реакциялық қоспаны дайындау

6.3.1.1 Сыйымдылығы 1,5 $см^3$ микроцентрифугалы түтікті микродозатормен (әр талданатын сынама есебінен): (3±0,1) $мм^3$ 10х ПЦР арналған реакциялық буферге 4.32 бойынша; (3±0,1) $мм^3$ дезоксирибонуклеозидтрифосфаттар қоспасын 4.36 бойынша [17], (2,5±0,1) $мм^3$ Taq-полимераза ферментін 4.31 бойынша [14] (концентрациясы 5 Ед. акт/$мм^3$)**, сонымен қатар праймерлердің су ерітіндісін 4.40 бойынша[21] келесі концентрацияда (нг/$дм^3$) енгізеді:

35S п/*35S* оф - 15,32/81,02;

gus п/*gus* оф - 3,75/37,59;

*nos*_п/*nos* оф - 3,61/84,74;

*npt*_п/*npt*_оф - 7,51/36,01;

*ocs*_п/*ocs* оф - 8,18/41,41.

Қоспаны ерекше таза зарарсыздандырған сумен көлемі (27±0,5) $мм^3$ дейін ерітеді (бір талданатын сынама есебінен) және мұқият (3-5) с ішінде сілкуге арналған аппаратта, көбік болдырмай араластырады. амПЦР арналған реакциялық қоспаның жалпы көлемін талданатын сынама санын есепке алып және екі бақылау сынамадан дайындайды: жағымды бақылау және жағымсыз бақылау (алдын ала трансгенді ДНК 4.37бойынша) және жағымсыз бақылау алдын ала трансгенді емес ДНК 4.38 бойынша).

6.3.1.2 6.3.1.1 бойынша алынған амПЦР арналған реакциялық қоспаны қысқа мерзімде 10-15 с) үстел центрифугасында айналым жиілігі (1500-3000) $мин^{-1}$ центрифугалайды және дереу талдау жүргізу үшін қолданылады.

6.3.2 амПЦР кезегінің барлығын білікті арнайы оқыған [23] талаптарына сәйкес жүргізу керек. амПЦР жүргізу үшін тек зарарсыздандырған зертханалық ыдысты және жаңа зарарсыздандырған микроцентрифугалы түтікті қолдануға болады. амПЦР жүргізу кезінде әр микроцентрифугалы түтікті сыналатын сынаманы енгізу немесе іріктеу алдында ашады, манипуляция аяқталған сәтінде дереу жабады. Талданатын сынамалары бар

бірнеше микроцентрифугалы түтіктерді бір уақытта ашуға және ұзақ уақыт ашық ұстауға тыйым салынады. Әр сыналатын сынаманы сүзгіші бар жаңа зарарсыздандырған ұшы бар микродозатомен іріктейді.

7 Талдау жүргізу

7.1 Асимметриялық мультиплекстік ПЦР жүргізу

7.1.1 6.3.1.2 бойынша микродозатормен алынған амПЦР үшін реакциялық қоспаны сыйымдылығы 0,2 немесе 0,5 $см^3$ әр қайсысы 27 $мм^3$ бойынша таза микро центрифугалық түтікке енгізеді.

7.1.2 6.2 бойынша бөлінген талданатын ДНК 3 $мм^3$ –дан амПЦР арналған реакциялық қоспасы бар микро центрифугалық түтікке 7.1.1 бойынша енгізеді. ДНК амплификаторын қолдану кезінде 4.3 [4] бойынша қақпақтарын жылытпай әр реакциялық қоспасы бар микро центрифугалық түтікке 30 $мм^3$ дан вазелин майын ГОСТ 3164 бойынша амПЦР су фазасы буланғаннан реакциялық қоспаның сақтау үшін енгізеді. Бұл жағдайда талданатын ДНК май қабатының астына енгізеді, оның салдарынан су және май фазасы пайда болады.

7.1.3 Екі басқа микроцентрифугалы түтікке микродозатормен 3 $мм^3$ тен алдын ала трансгенді ДНК (жағымды бақылау) және алдын ала трансгенді емес ДНК (жағымсыз бақылау) енгізеді.

7.1.4 7.1.3 бойынша дайындалған ерітінділері бар және 7.1.2 бойынша алынған қоспасы бар барлық микро центрифугалық түтікке ДНК амплификаторын орналастырады және 2 кестеде келтірілген бағдарлама бойынша амПЦР келтіреді.

2 Кесте — амПЦР жүргізу бағдарламасы

Бағдарлама қадамы	Температура, әС	Инкубация уақыты	Кезеңдер саны
1	95	5 мин	1
2	95	30 с	37
	62	30 с	
	72	30 с	
3	72	5 мин	1

7.2 Биологиялық микрочиптегі гибридтеу

7.2.1 Шаған центрифугалық түттікке микродозатормен қажетті мөлшерде 6.1.4 бойынша дайындалған 24 $мм^3$ тен гибридтеу буферін енгізеді. Сосын гибридтеу буферіне 12 $мм^3$ -ден амПЦР жүргізу нәтижесінде алынған су фазасын 7.1.4 бойынша қосады, және (20-30) с ішінде гибридтеу қоспасын алу үшін сілкуге арналған аппаратта 4.10 бойынша айналым жиілігі 1500 $мин^{-1}$ кем емес араластырады.Әр микро центрифугалық түтікке

микродозатормен 7.2.1 бойынша алынған 28 мм^3 ден гибридтеу қоспасын (әр биологиялық микрочип үшін) іріктейді, және барлық

7.2.2 қоспаны биологиялық микрочип бетіне пластик қақпағы тесігі арқылы орналастырады. Гибридтеуді термостатта [5] 37 °С температурада 18 с ішінде жүргізеді.

7.2.3 Гибридтеу аяқталған соң пластик қақпақтарын алады, әр биологиялық микрочипті үш рет тазартылған сумен ГОСТ 6709 бойынша 25 °С температурада жуады және бөлме температурасында кептіреді.

Өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіру әдісінің сұлбасы (ГТК) А қосымшасында келтірілген.

8 Талдау нәтижелерін өңдеу

8.1 Талданатын сынама үшін биологиялық микрочипте гибридтеу суретін көзбен шолуды аппаратты-бағдарламалық кешен көмегімен “Чипдетектор-03” биологиялық микрочип флуоресценциясын талдау [3] және компьютерлік бағдарлама үшін жүзеге асырады Imageware [2].

8.2 Талданатын сынама үшін компьютер экранында алынған гибридтеу суретін жағымды бақылауға арналған гибридтеу суретімен (алдын ала трансгенді ДНК) және жағымсыз бақылау үшін гибридтеу суретімен (алдын ала трансгенді емес ДНК) салыстырады. Биологиялық микрочиптің гельді ұяларында амПЦР флуоресцентті өнімдері Б қосымшасында келтірілген. Құрамында мобилизациялық олигонуклеотидтер бар (*35S* промоторлар және *nos,* терминатор *ocs, gus немесе nptII* гендер үшін*)* биологиялық микрочиптің гельді құрамында ерекше флуоресцентті дабылдың жоғары деңгейі болуы талданатын сынамада ДНК нақты бөтен тізбектердің болуы туралы, яғни талданатын сынаманың трансгендігі туралы куәландырады. Жағымсыз бақылаудың фондық флоуресценциясының деңгейімен салыстырылатын гибридтеуден кейін биологиялық микрочиптің гельді ұясында флуоресцентті дабылдардың төменгі деңгейі, бірақ Imageware бағдарламасында сезімталдықтың белгіленген босағасынан жоғары емес талданатын сынамада ДНК нақты бөтен тізбектілігі жоқтығын көрсетеді, яғни талданатын ДНК трансгендігі еместігі туралы .

8.3 Нәтижелер интерпретациясы

8.3.1 Imageware [2] бағдарламасында берілген сезімталдық босағасынан асатын иммобилизциялық олигонуклеотидтері бар биологиялық микрочиптің бір, бірнеше немесе барлық бес гельді ұялары флоуресценциясының жоғары деңгейі талданатын өнімде генетикалық түрлендірілген көздердің (ГТК) болуы туралы куәландырады.

8.3.2 Imageware бағдарламасында берілген сезімталдық босағасына жетпейтін және жағымсыз бақылаудың фондық флоуресценциясына жақын иммобилизциялық олигонуклеотидтері бар биологиялық микрочиптің барлық

бес гельді ұялары флоуресценциясының төменгі деңгейі талданатын өнімде генетикалық түрлендірілген көздердің (ГТК) жоқтығы туралы куәландырады.

8.3.3 Алдын ала трансгенді емес ДНК пайдалану кезінде гельді ұялар флоуресценциясының жоғары деңгейі жалған жағымды нәтижелерді алуы туралы куәландырады. Себебі ГМИ-ның реактивтердің және (немесе жабдықтардың) ластануы болуы мүмкін. Бұл жағдайда зертханалық үстелдердің және жабдықтардың беттерін тұз қышқылымен (1 моль/дмі) сүрту керек, реактивтерді жаңадан дайындалғандарға ауыстыру және талдауды қайталау керек. Қайта талдауда алынған гельді ұялар флоуресценциясының төменгі деңгейі алдын ала трансгенді емес ДНК пайдалану кезінде соңғы болып табылатын сенімді нәтижелер туралы куәландырады.

8.3.4 Алдын ала трансгенді емес ДНК пайдалану кезінде флуоресцентті дабылдың төменгі деңгейі (жоқтығы) жалған жағымсыз нәтижелерді алу туралы куәландырады. Себебі ПЦР үшін реакциялық қоспалар компоненттерінің бірінің белсенділігін жоғалту немесе амПЦР жүргізу шарттарын сақтамау немесе және (немесе) биологиялық микрочипте гибридтеу болуы мүмкін. Бұл жағдайда реактивтерді жаңадан дайындағандарға ауыстыру және талдауды қайталау болуы мүмкін. Қайта талдау кезінде алынған гельді ұяларды флоуресценциялаудың жоғары деңгейі ала трансгенді ДНК пайдалану кезінде соңғы болып табылатын сенімді нәтижелер туралы куәландырады.

9 Талдау нәтижелерін рәсімдеу

Өнімде генетикалық түрлендірілген көздердің болуын талдау нәтижелері рәсімдеу үлгісі В қосымшасында келтірілген хаттамамен ресімделеді.

10 Қауіпсіздік талаптары

10.1 Жұмыстарды орындау кезінде химиялық реактивтермен жұмыс істеу кезінде қауіпсіздік техникасы талаптарын ГОСТ 12.1.007 бойынша сақтау қажет. Бромды этидий ерітіндісімен және жуылған гельмен жұмыс істеу кезінде резеңке қолғаппен жұмыс істеу қажет.

10.2 Жұмыстар жүргізілген бөлме жалпы кіру-сору желдеткішімен ГОСТ 12.4.021 бойынша жабдықталуы тиіс. Жұмыс аумағы ауасындағы зиянды заттар құрамы ГОСТ 12.1.005 белгіленген нормалардан аспау керек.

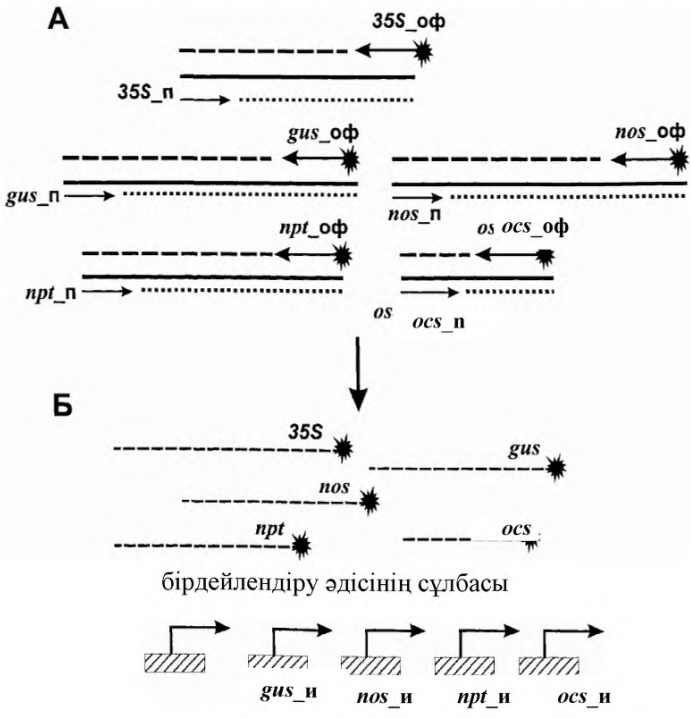
10.3 Электр қондырғылармен жұмыс істеу кезінде қауіпсіздік ГОСТ 12.1.019 талаптарына сәйкес болу тиіс. Зертхана бөлмелері өрт қауіпсіздігі талаптарына ГОСТ 12.1.004 бойынша сәйкес болу тиіс және ГОСТ 12.4.009 бойынша өрт сөндіру құралдары болу тиіс.

10.4 УФ-сәулеленумен жұмыс істеу кезінде қорғау экранын және қорғау көзілдірігін қолдану керек.

10.5 Бақылау кезінде қолданылатын қауіпті материалдармен және реактивтермен жұмыс істеу кезінде [24] ескерілген қауіпсіздік талаптарын, сонымен қатар олардың нормативтік құжаттарын сақтау керек.

А қосымшасы
(анықтамалық)

Өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК)



бірдейлендіру әдісінің сұлбасы

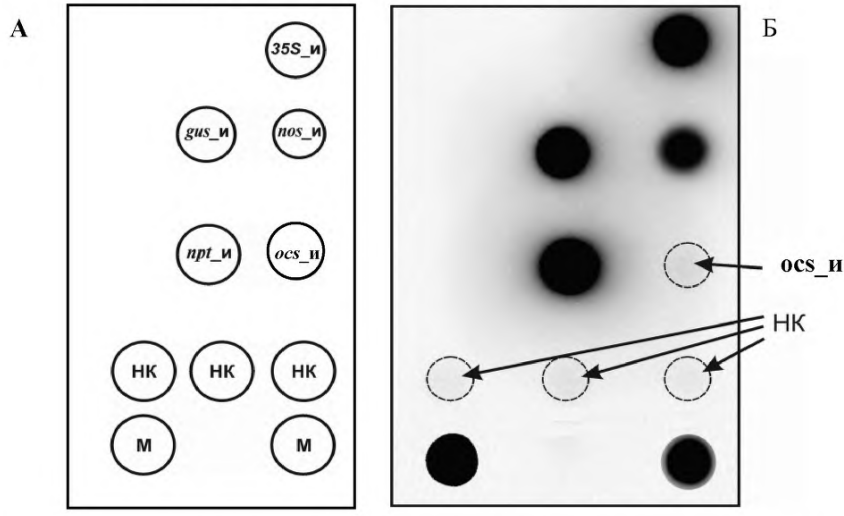
А— амПЦР флуоресцентті-таңбаланған праймерлерді қолданып (индекс "_оф"); Б —биологиялық микрочипте иммобилизацияланған (индекс "_және) арнайы олигонуклеотидтері бар ПЦР өнімдерін гибридтеу

А.1 Сурет

Б қосымшасы
(міндетті)

Флюоресцентті өнімдердің амПЦР биологиялық микрочипіндегі гибридтеу суретінің үлгісі

(құрамында промоторлар *35S* бар генетикалық түрлендірілген картопты талдау нәтижесінде алынған компьютер экранындағы гибридтеу суреті, геналар *gus және nptII және* промотор *nos)*



А —Өсімдік текті генетикалық түрлендірілген көздерді (ГТК) бірдейлендіруге арналған биологиялық микрочип сұлбасы

Б —ДНК талданатын, промотор *35S, gus және nptII* гендер, *сонымен қатар* промотор *nos бар* флуоресценті өнімдердің биологиялық микрочипінде гибридтеу суреті. Сызықшамен Imageware бағдарламасында берілген сезімталдық босағасына жетпейтін фондыққа жақын флоуресценция деңгейімен биологиялық микрочиптің гельдік ұялары белгіленген.

Б.1 Сурет

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: Тұқымдық картоп
Шикізатты немесе өнімді өндіруші _____""Вымпел" ЖШС
Өнімді немесе шикізатты ұсыну_____"Биотест-М".
Сынамаларды іріктеу жүргізілді_ГОСТ 11856-89
(тиісті біркелкі шикізат немесе өнім тобының нормативтік құжаттарына сәйкес)
Сынамаларды іріктеу актісі және сынауға техникалық тапсырма №_5 01.12.200_ж.
Сынаулар ҚР СТ* талаптар негізінде жүргізілді.
Үлгі нөмірі _____6/2004, 7/2004, 8/2004 және 9/2004__.
Сыналатын үлгінің сипаттамасы (таңбалау, түрі және орама жағдайы, заттаңба, сызықтау) ____

Таңбалау _____–

_____дейін жарамды Сызықшалы коды _____.

Сынау нәтижелері

Үлгі нөмірі	Трансгенді тізбектілік				
	35S	*gus*	*nos*	*nptII*	*ocs*
6/2004	Жоқ	Жоқ	Жоқ	Жоқ	Жоқ
7/2004	Бар	Бар	Жоқ	Бар	Бар
8/2004	Жоқ	Жоқ	Жоқ	Жоқ	Жоқ
9/2004	Бар	Жоқ	Бар	Жоқ	Жоқ

Талдау нәтижелері: 7/2004 және 9/2004 үлгілерде келесі трансгенді компоненттер табылды:

№ 7/2004 үлгіде *gus* және *nptII* гендерінің гомологтары, *35S* промоторлар, *osc,* ал № 9/2004 үлгіде *35S* промоторлар және *nos* табылды. № 6/2004 және 8/2004 үлгілерде трансгенді компоненттер табылмады. № 6/2004,

7/2004 және 8/2004 үлгілерде ГТК өнімдерінде болуы туралы хабарлайтын қаптамадағы таңбалау жоқ, ал № 9/2004 үлгілерде бар.

* Стандарт әзірленуде

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]	Қазақстан Республикасының Заңы	Тамақ өнімдерінің сапасы және қауіпсіздігі туралы
[2]	Биологиялық микрочиптер орталығы ИМБ РАН	“Чипдетектора-03” көмегімен алынған бейнелерді талдауға арналған “Imageware” компьютерлік бағдарламасы
[3]	ТШ 9443-001-02699501-2003	“Чипдетектор-03” биологиялық микрочиптер флуоресценциясын талдауға арналған аппаратты-бағдарламалық кешен
[4]	ТШ 9642-001-4648062-98	“Терцик МС-2” амплификаторы
[5]	ТШ 42-619-61	ТВЗ-25 құрғақ ауалы термостат
[6]	“Эппендорф” Корпорациясы, кат. № 5425000.014	5415С, 13000 мин$^{-1}$ үстел микроцентрифугасы
[7]	“Хеликон” Корпорациясы, кат. № MSH-300	Жылытуы бар магнитті былғауыш
[8]	“Хеликон” Корпорациясы, кат. № CV-1500	Сілкуге арналған аппарат (- “Вортекс” центрифугасы)
[9]	“Хеликон” Корпорация, кат. № RP-30 и RP-80	Микроцентрифужды түтіктерге арналған штативтер
[10]	“Хеликон” Корпорациясы, кат. № FA 104; FA 108; FA 111; FA 113N	Микротамызғышқа арналған фильтрі бар ұш
[11]	ТШ 6-09-11-1721-83	Этилендиаминтетра сірке қышқылы натрийлі тұз дигидраты
[12]	ТШ 6-09-4292-76	Трис (оксиметил) аминометан [NH_2C

		$(CH2OH)_3$]
[13]	“Сигма Алдрич” Корпорациясы (“Sigma”), кат. № L-6026	Натрий додецилсульфаты (SDS)
[14]	“Сигма Алдрич” Корпорациясы (“Sigma”), кат. № Д 1806	Taq-полимераз ферменті 5 Ед.акт./$мм^3$
[15]	“Хеликон” Корпорациясы, кат. № Am-038-0.5	Гуанидин тиоцианат [CH_3N_3-HSCN]
[16]	“Хеликон” Корпорациясы, кат. № Am-0485-01	N-[2-оксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [$C_8H_{17}N_2O_4SNA$]
[17]	“Хеликон” Корпорациясы, кат. № H-4044-0.4	дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, әрқайсысы **25 мМ**тен қоспа ерітіндісі
[18]	ИФР РАН	100 нг/$мм^3$ немесе 10^6 көшірмелер/$мм^3$ шамасында алдын ала трансгенді ерітіндісі
[19]	ИФР РАН	100 нг/$мм^3$ немесе 10^6 копий/$мм^3$ шамасында алдын ала трансгенді ерітіндісі
[20]	ТШ 46-22-603-75	Электр немесе от жылытуымен су моншасы
[21]	Биологиялық микрочиптер орталығы ИМБ РАН	“ПР-1” праймерлерінің су ерітіндісі
[22]	Биологиялық микрочиптер орталығы ИМБ РАН	Иммобилизацияланған олигонуклеотидтері бар гельді микрочиптер
[23]	Полимеразды тізбекті реакция әдісін пайдаланылатын диагностикалық зертханаларда жұмыстарды жүргізу	Ресей Федерациясы санэпид-қызметінің бас комитеті; № 06-19/52-17 от 15.06.95

	жөніндегі әдістемелік ұсыныстар. Негізгі ережелер	
[24]	СЕ 1.2.006-93	Микроорганизмдермен жұмыс қауіпсіздігі жөніндегі санитарлық ережелер. 1 Бөлік.
[25]	“Биобақылау” ЖШҚ	“Био-1” Компьютерлік бағдарлама
[26]	“Биобақылау”ЖШҚ	“Евробио-ВТО” флуоресценцияны талдауға арналған аппараттық-бағдарламалы кешен

ӘОЖ 663/.664:543.06:006.354

МСЖ

65.160
67.060
67.080
67.100
67.120
67.140
67.160
67.180
67.190
67.200
67.220
67.230

МСЖ

H11
H13
H17
H23
H27
H31-H34
H36
H41-H43
H51-H56
H62
H65
H68
H72-H74
H81
H97

МСЖ

C 11- 13
C21
C23-C25
C32-C36
C41-C45
C52

Түйінді сөздер:бірдейлендіру, шикізат және тамақ өнімдері, генетикалық түрлендірілген көздер, асимметриялық мультиплексті полимеразды тізбекті реакция, биологиялық микрочип, гибридтеу, праймер, олигонуклеотидте, ДНК тізбектілігі, трансгенді емес ДНК, трансгенді ДНК, флоуресценция қарқындылығы

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Биологическая безопасность
Сырье и продукты пищевые

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ (ГМИ) РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА

СТ РК 1345-2005
(ГОСТ Р 52174-2003, 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 52174-2003 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников(ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа, путем приведения использованной в ГОСТ Р 52174-2003 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	3
5	Отбор проб	7
6	Подготовка к проведению анализа	7
7	Проведение анализа	10
8	Обработка результатов анализа	11
9	Контроль результатов идентификации	13
10	Требования безопасности	13
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 С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА

Дата введения 2006.07.01.

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевое сырье (в том числе посевной и посадочный материал), пищевые продукты, цветы (далее — продукт) и устанавливает метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с использованием биологического микрочипа.

Метод основан на асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции (далее — амПЦР) с последующей гибридизацией продуктов этой амПЦР на биологическом микрочипе. Метод одновременно устанавливает наличие или отсутствие в анализируемой пробе не менее пяти различных трансгенных последовательностей ДНК. Чувствительность метода — не менее 10^{-12} г (1 пг) ДНК.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 3118-77 Кислота соляная. Технические условия.

Издание официальное

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 9284-75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия.

ГОСТ 9805-84 Спирт изопропиловый. Технические условия.

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 12738-77 Колбы стеклянные с градуированной горловиной. 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 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.

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

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **Биологическая безопасность:** Защищенность человека, общества и окружающей среды от негативного воздействия токсических, аллергенных, канцерогенных, мутагенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

3.1.2 ***Генетически модифицированные источники:*** *Сырье и продукты растительного и (или) животного происхождения, полученные с использованием методов генной инженерии [1].*

3.1.3 ***Генетически модифицированный организм:*** *Организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал (гены, их фрагменты, или комбинации генов) [1].*

3.1.4 **Генная инженерия:** Совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, по выде-

лению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

3.1.5 **Биологический микрочип:** Микроматрица с ячейками, в которых иммобилизован набор олигонуклеотидов.

3.1.6 **Праймер:** Последовательность однотяжевой ДНК длиной до 25 нуклеотидов, применяемая для проведения асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции.

3.1.7 **Асимметричная мультиплексная полимеразная цепная реакция:** Полимеразная цепная реакция, где в одной пробирке с участием нескольких пар праймеров одновременно амплифицируются разные последовательности анализируемой ДНК, причем количество одного из праймеров каждой пары в несколько раз превышает количество другого праймера.

3.2 В настоящем стандарте применяются следующие сокращения:

3.2.1 ***амПЦР*** *- асимметричная мультиплексная полимеразная цепная реакция.*

3.2.2 ***ГМИ*** *- генетически модифицированные источники.*

4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Компьютерная программа "Imageware" для анализа изображений, полученных с помощью "Чипдетектора-03" [2] *или "Био-1" [25] .*

4.2 Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов типа "Чипдетектор-03" [3] *или "Евробио-ВТО" [26].*

4.3 Амплификатор ДНК типа "Терцик МС-2" под микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2, 0,5 $см^3$ со скоростью нагрева (охлаждения) активного элемента не менее 1,5 °С/с [4].

4.4 Термостат суховоздушный типа ТВЗ-25 с рабочей температурой 37 ° С, рабочий диапазон от 20 ° С до 60 ° С, точность поддержания температуры **±1 °**С [5].

4.5 Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности [уловное обозначение (II)] с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более +0,0001 г.

4.6 Камера морозильная по ГОСТ 26678, обеспечивающая температуру минус 20 °С, с допускаемой погрешностью ± 0,5 ^{0}С. Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

4.7 Микроцентрифуга настольная типа 5415С с частотой вращения не менее 13000 $мин^{-1}$ [6].

4.8 Мешалка магнитная с подогревом [7].

4.10 Аппарат для встряхивания типа CV – 1500 с частотой вращения не менее 1500 $мин^{-1}$ [8].

4.11 pH-метр с набором электродов, с погрешностью измерений **±0,**1 pH.

4.12 Микродозаторы с переменным объемом дозирования: (0,5-10,0) $мм^3$ [шаг- 0,1 $мм^3$, точность ± (2,5-10,0) %, воспроизводимость (3-7) %]; (5,0-50,0) $мм^3$

[шаг- 0,5 $мм^3$, точность ±(2,0-5,0) %, воспроизводимость (2,5-5,0) %]; (20,0-200,0) $мм^3$ [шаг- 1,0 $мм^3$, точность ±(1,5-2,0) %, воспроизводимость (2-3) %]; (100-1000) $мм^3$ [шаг - 5 $мм^3$, точность ± (1,0-1,5) %, воспроизводимость (1-2) %].

4.13 Штативы под микроцентрифужные пробирки типа RP-30 и RP-80 на 30 и 80 шт. [9].

4.14 Наконечники с фильтром для микродозаторов (микропипеток) с переменным объемом дозирования жидкостей до 10; 20; 200; 1000 $мм^3$ [10].

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

4.16 Пестик или палочка стеклянные по ГОСТ 21400 для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 $см^3$.

4.17 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные по ГОСТ 1770 на 25, 100, 250 и 1000 $см^3$.

4.18 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические по ГОСТ 25336 вместимостью (50-1000) $см^3$.

4.19 Пипетки стеклянные градуированные по ГОСТ 29227.

4.20 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.21 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

4.22 Кислота соляная концентрированная по ГОСТ 3118, х.ч.

4.23 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.

4.24 Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль дигидрат (ЭДТА) [11].

4.25 Трис (оксиметил) аминометан [12].

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

4.27 Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, х.ч.

4.28 Додецилсульфат натрия (SDS) [13].

4.29 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.30 Вода особо чистая стерильная, не содержащая ДНК, РНК и дезоксирибонуклеаз.

4.31 Фермент термостабильный Taq - полимераза, оптимум активности при (70-72) °С [14].

4.32 ПЦР буфер десятикратный (10х; 12,1 г в 1 $дм^3$ Трис-HCl, pH 8,8; 37,28 г в 1 $дм^3$ KC1, 5 % Твин-20, 50 % формамид; 142,83 мг в 1 $дм^3$ $MgCl_2$).

4.33 Гуанидин тиоцианат [15].

4.34 N-[2-оксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [16].

4.35 Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.

4.36 Раствор водный дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ с концентрацией 25 мМ каждого [17].

4.37 Раствор заведомо трансгенной ДНК (около 100 нг/$мм^3$ или 10^6 копий/$мм^3$) [18].

4.38 Раствор заведомо нетрансгенной ДНК (около 100 нг/$мм^3$ или 10^6 копий/$мм^3$) [19].

4.39 Баня водяная [20].

4.40 Раствор водный праймеров "ПР-1" для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров:

- праймеры на промотор 35*S* вируса мозаики цветной капусты:

*35S*_п *5′* CCT CCT CGG ATT CCA TTG CCC AG (23 н.о.)

*35S*_оф *5′* GTC CAT CTT TGG GAC CAC TGT CGG (24 н.о.)

- праймеры на маркерный ген *gus* из бактерии *Escherichia coli:*

*gus*_п *5′* AAG CCG GGC AAT TGC TGT GCC A (22 н.о.)

*gus*_оф *5′* GAC CGC ATC GAA ACG CAG CAC G (22 н.о.)

- праймеры на промотор *nos* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens:*

*nos*_п *5′* CGA TGA CGC GGG ACA AGC CGT (21 н.о.)

*nos*_оф *5′* GAC CTT AGG CGA CTT TTG AAC GCG C (25 н.о.)

- праймеры на маркерный ген *nptII* из транспозона Т**n**5 бактериального происхождения:

*npt*_п *5′* GTG TTC CGG CTG TCA GCG CAG G (22 н.о.)

*npt*_оф *5′* CGC AAC GAA CGC CCG TCG TGG (21 н.о.)

- праймеры на терминатор *ocs* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens:*

*ocs*_п *5′* GCG AGA CGC CTA TGA TCG CAT GAT (24 н.о.)

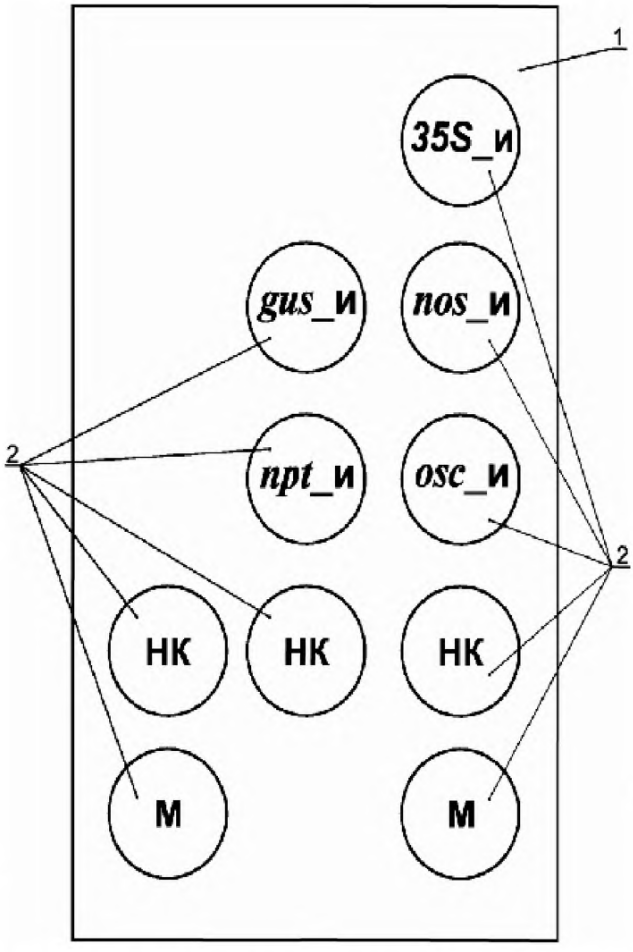
*ocs*_оф *5′* GAA ACC GGC GGT AAG GAT CTG AGC (24 н.о.)

Примечание — В обозначениях праймеров индекс **"_п"** означает "прямой", индекс **"_оф"** означает "обратный флуоресцентномеченый"; н.о. — нуклеотидные остатки [21].

4.41 Биологический микрочип с иммобилизованными *олигонуклеотидами [22],* приведенными в таблице 1:

Таблица 1 - Олигонуклеотиды, иммобилизованные на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Последовательность олигонуклеотида
*35S*_и	Промотор *35S*	5' GCC ATC ATT GCG ATA
*gus*_и	Ген *gus*	5' CTG GTA TCA GCG CGA
*nos*_и	Промотор *nos*	5' GCT AAG CAC ATA CGT
*npt*_и	Ген *nptII*	5' GGC AGC GCG GCT ATC
*ocs*_и	Терминатор *ocs*	5' TTC TGT TGT GCA CGT
Примечание — Индекс "_и" означает "иммобилизованный".		



1 - предметное стекло
2 - гелевые ячейки

Рисунок 1 – Схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения

4.41.1 Биологический микрочип представляет собой стандартное предметное стекло по ГОСТ 9284 для световой микроскопии, на поверхности которого в определенном порядке расположены 10 микроскопических ячеек (рисунок 1), заполненные полиакриламидным гелем. Каждая из пяти верхних ячеек содержит индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (*35S, gus, nos, npt* или *ocs).*

Три ячейки с индексом "НК" не содержат ранее перечисленных индивидуальных ковалентно иммобилизованных олигонуклеотидов и выполняют роль от-

рицательного контроля гибридизации. Две ячейки с индексом "М" содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для однозначной ориентации биологического микрочипа. Поверхность биологического микрочипа с ячейками должна быть закрыта пластиковой крышкой с отверстиями, которая вместе с предметным стеклом образует замкнутое пространство, предназначенное для проведения гибридизации анализируемой пробы.

4.42 Часы с диапазоном измерения 24 часа и точностью ±5 с.

4.43 *Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и 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 (в том числе посевного и посадочного материала), пищевых продуктов, цветов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление раствора NaOH концентрации 40 г/дм^3

В стеклянную плоскодонную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см^3 помещают **(4,0±0,01)** г сухой гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 и растворяют в 100 см^3 особо чистой стерильной воды по 4.30. После охлаждения раствора до комнатной температуры его переливают в специальную щелочеустойчивую пластиковую плотно закрывающуюся емкость. Срок хранения при комнатной температуре — не более одного года.

6.1.2 Приготовление раствора ЭДТА концентрации 186,12 г/дм^3

В стеклянную плоскодонную колбу вместимостью 100 см^3 помещают **(18,61±0,01) г** ЭДТА по 4.24, растворяют в 80 см^3 особо чистой стерильной воды при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке [7]. Затем раствором гидроокиси натрия по 6.1.1 доводят pH раствора до 8,0. Полученный раствор переливают в мерную колбу по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см^3 и особо чистой стерильной водой доводят объем этого раствора до метки. Срок хранения в холодильнике по ГОСТ 26678 при температуре **(4-5)** °С — не более 6 мес.

6.1.3 Приготовление 70 %-ного раствора этилового спирта

В мерную колбу вместимостью 200 см^3 по ГОСТ 12738 вносят 140 см^3 96 %-ного этилового спирта высокой степени очистки по ГОСТ Р 51652, добавляют 52 см^3 особо чистой стерильной воды и перемешивают. Срок хранения при температуре **(4-5)** °С — не более 6 мес.

6.1.4 Приготовление гибридизационного буфера

В стеклянный стакан или плоскодонную колбу вместимостью (300—500) $см^3$ помещают точно отмеренные количества: **(44,33 ±0,01)** г гуанидин тиоцианата — по 4.33 [15], **(4,88±0,01)** г N-[2- гидроксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфоновой кислоты] натриевой соли (HEPES) по 4.34 [16]. Затем стеклянной пипеткой по ГОСТ 29227 вместимостью 5 $см^3$ приливают *3,75* $см^3$ раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2, и цилиндром вместимостью 250 $см^3$ добавляют 200 $см^3$ особо чистой стерильной воды. Стакан с раствором помещают на магнитную мешалку по 4.9 [7] и перемешивают до полного растворения компонентов. Доводят значение pH буфера до (7,5±0,1) добавлением раствора гидроокиси натрия, приготовленного по 6.1.1. Полученный раствор из стакана переносят в мерную колбу вместимостью 250 $см^3$, доводят объем до метки особо чистой стерильной водой и разливают по 50 $см^3$ в плоскодонные колбы с притертыми пробками. Срок хранения при температуре **(2-8)** °С — не более 12 мес.

6.1.5 Приготовление раствора Трис-HCl концентрации 242,2 $г/дм^3$

В колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают **(24,22±0,01)** г Трис (оксиметил) аминометана по 4.25 [12] и растворяют приблизительно в 80 $см^3$ особо чистой стерильной воды. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5, а объем — до 100 $см^3$ особо чистой стерильной водой. Срок хранения при комнатной температуре — не более 6 мес.

6.1.6 Приготовление раствора NaCl концентрации 146,2 $г/дм^3$

В плоскодонную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают **(14,62±0,1)** г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют **в (70-80)** $см^3$ особо чистой стерильной воды, затем полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и особо чистой стерильной водой доводят до метки. Срок хранения при комнатной температуре — не более одного года.

6.1.7 Приготовление раствора 20 %-ного додецилсульфата натрия (SDS) [13]

В стеклянную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают **(20 ± *0,01)*** г сухого додецилсульфата натрия по 4.27 и добавляют 80 $см^3$ особо чистой стерильной воды. Растворяют при плавном перемешивании на магнитной мешалке и одновременном нагревании до температуры **(40-50)** ° С до полного растворения. Срок хранения при комнатной температуре — не более одного года.

6.1.8 Приготовление буфера экстракции

В мерной колбе вместимостью 50 $см^3$ смешивают **(5±0,01)** $см^3$ раствора Трис-HCl, приготовленного по 6.1.5, **(5±0,01)** $см^3$ раствора NaCl, приготовленного по 6.1.6; **(1,25 ±0,01)** $см^3$ раствора 20 %- ного SDS, приготовленного по 6.1.7 и **(2,5 ±0,01)** $см^3$ раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2; каждый раствор отбирают отдельной стеклянной пипеткой. Объем раствора доводят до 50 $см^3$ особо чистой стерильной водой. Срок хранения при температуре (4 – 5) °С — не более двух недель, в морозильной камере по ГОСТ 26678 при температуре минус 20 ° С — не более одного года.

6.1.9 Раствор Taq-полимеразы по 4.31 хранят при температуре минус 20 °С не более одного года. Не допускается хранение раствора Taq – полимеразы ниже температуры минус 23 °С.

6.2 Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК)

6.2.1Две навески каждого анализируемого продукта массой **(60-80) мг** помещают в две чистые стерильные микроцентрифужные пробирки по 4.15 вместимостью 1,5 $см^3$, в течение **(15-20)** с доводят до состояния однородной смеси пестиком по ГОСТ 21400 при комнатной температуре и сразу микродозатором добавляют по 400 $мм^3$ буфера экстракции, приготовленного по 6.1.8.

6.2.2Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 6.2.1, интенсивно встряхивают в течение 5 с на аппарате для встряхивания по 4.10 [8], быстро нагревают на водяной бане [20] до температуры 65 °С и выдерживают при этой температуре **(15-20)** мин, периодически осторожно перемешивая содержимое.

6.2.3Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 6.2.2, центрифугируют при комнатной температуре в настольной центрифуге по 4.8 [6] при частоте вращения 13000 $мин^{-1}$ в течение 5 мин.

6.2.4Надосадочную жидкость, полученную по 6.2.3, отбирают по **(300±1,0)** $мм^3$ и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, содержащие по 300 $мм^3$ изопропилового спирта по ГОСТ 9805. Содержимое перемешивают, выдерживают 5 мин при комнатной температуре и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 $мин^{-1}$.

6.2.5Надосадочную жидкость по 6.2.4 тщательно удаляют микродозатором, а осадок ДНК, полученный по 6.2.4, промывают 1 $см^3$ 70 %-ного этилового спирта, приготовленного по 6.1.3 и охлажденного до температуры (0 – 4) °С, центрифугируют аналогично 6.2.4. Полученную надосадочную жидкость вновь тщательно удаляют, а осадок ДНК подсушивают при комнатной температуре до полного удаления этилового спирта, но не более 30 мин.

6.2.6Осадок ДНК, полученный по 6.2.5, перерастворяют **в (40-50)** $мм^3$ особо чистой стерильной воды. Полученный раствор ДНК используют для проведения амПЦР. Срок хранения раствора ДНК при температуре минус 20 °С — не более одного года.

6.3 Подготовка асимметричной мультиплексной ПЦР

6.3.1 Приготовление реакционной смеси для амПЦР*

6.3.1.1 В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 $см^3$ микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): **(3±0,1)** $мм^3$ 10х буфера реакционного для ПЦР по 4.32; **(3±0,1)** $мм^3$ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.36 [17], **(2,5±0,1)** $мм^3$ фермента Taq-полимеразы по 4.31 [14] (концентрацией 5 Ед. акт/$мм^3$)**, а также водный раствор праймеров по 4.40 [21] в следующих концентрациях (нг/$дм^3$):

*35S*_п/*35S*_оф - 15,32/81,02;

*gus*_п/*gus*_оф — 3,75/37,59;

*nos*_п/*nos*_оф — 3,61/84,74;

*npt*_п/*npt*_оф — 7,51/36,01;
*ocs*_п/*ocs*_оф — 8,18/41,41.

Смесь разбавляют особо чистой стерильной водой до объема **(27±0,5)** мм^3 (из расчета на одну анализируемую пробу) и осторожно перемешивают в течение (3—5) с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены. Общий объем реакционной смеси для амПЦР готовят с учетом числа анализируемых проб и двух контрольных проб: положительный контроль (заведомо трансгенная ДНК по 4.37) и отрицательный контроль (заведомо нетрансгенная ДНК по 4.38).

6.3.1.2 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 6.3.1.1, осаждают кратковременным **(10-15) с** центрифугированием на настольной центрифуге при частоте вращения (1500 – 3000) мин$^{-1}$ и сразу же используют для проведения анализа.

6.3.2 Все этапы амПЦР должен проводить квалифицированный, специально обученный персонал в соответствии с требованиями [23]. Для проведения амПЦР допускается использовать только стерильную лабораторную посуду и новые стерильные микроцентрифужные пробирки. При проведении амПЦР каждую микроцентрифужную пробирку открывают только перед отбором или внесением анализируемой пробы, а по окончании манипуляции сразу же закрывают. Запрещается открывать одновременно несколько микроцентрифужных пробирок с анализируемыми пробами и оставлять их открытыми длительное время. Каждую анализируемую пробу отбирают микродозатором с новым стерильным наконечником с фильтром.

7 Проведение анализа

7.1 Проведение асимметричной мультиплексной ПЦР

7.1.1 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 6.3.1.2, микродозатором вносят в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 см^3 по **(27±0,1)** мм^3 в каждую.

7.1.2 Анализируемую ДНК, выделенную по 6.2, вносят микродозатором по 3 мм^3 в микроцентрифужные пробирки с реакционной смесью для амПЦР по 7.1.1. При использовании амплификатора ДНК по 4.3 [4] без подогрева крышки в каждую микроцентрифужную пробирку с реакционной смесью вносят по **(30±0,1)** мм^3 вазелинового масла по ГОСТ 3164 для предохранения реакционной смеси от испарения водной фазы при амПЦР. В этом случае анализируемую ДНК вносят под слой масла, в результате чего образуются водная и масляная фазы.

7.1.3 В две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 3 мм^3 раствора заведомо трансгенной ДНК (положительный контроль) и раствора заведомо нетрансгенной ДНК (отрицательный контроль).

---

* Реакционную смесь для амПЦР готовят непосредственно перед анализом при температуре не выше 20 °С.

** Срок хранения Taq-полимеразы после разведения при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 2 ч.

7.1.4 Все микроцентрифужные пробирки со смесями, полученными по 7.1.2, и растворами, подготовленными по 7.1.3, помещают в амплификатор ДНК и проводят амПЦР по программе, указанной в таблице 2.

Таблица 2 — Программа проведения амПЦР

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Число циклов
1	95	5 мин	1
2	95	30 с	37
	62	30 с	
	72	30 с	
3	72	5 мин	1

7.2 **Гибридизация на биологическом микрочипе**

7.2.1 В необходимое количество микроцентрифужных пробирок микродозатором вносят по 24 мм^3 гибридизационного буфера, приготовленного по 6.1.4. Затем к гибридизационному буферу добавляют по 12 мм^3 водной фазы ПЦР-смеси, полученной в результате проведения амПЦР по 7.1.4, и перемешивают в течение **(20—30)** с на аппарате для встряхивания по 4.10 с частотой вращения не менее 1500 мин$^{-1}$ для получения гибридизационной смеси.

7.2.2 Из каждой микроцентрифужной пробирки микродозатором отбирают по 28 мм^3 гибридизационной смеси (для каждого биологического микрочипа), полученной по 7.2.1, и всю смесь помещают на поверхность биологического микрочипа через отверстие в пластиковой крышке. Гибридизацию проводят в термостате [5] при температуре 37 °С в течение 18 ч.

7.2.3 После окончания гибридизации пластиковые крышки снимают, каждый биологический микрочип трижды промывают дистиллированной водой по ГОСТ 6709 при температуре 25 °С и высушивают при комнатной температуре.

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения приведена в приложении А.

8 Обработка результатов анализа

8.1 Визуализацию гибридизационной картины на биологическом микрочипе для анализируемой пробы осуществляют с помощью аппаратно-программного комплекса для анализа флуоресценции биологических микрочипов "Чипдетектор-03" [3] и компьютерной программы Imageware [2] **или "Био-1" [25].**

8.2 Полученную на экране компьютера гибридизационную картину для анализируемой пробы сравнивают с гибридизационной картиной для положительного контроля (заведомо трансгенной ДНК) и гибридизационной картиной для отрицательного контроля (заведомо нетрансгенной ДНК). Пример гибридизацион-

ной картины флуоресцентных продуктов амПЦР в гелевых ячейках биологического микрочипа приведен в приложении Б. Наличие высокого уровня специфического флуоресцентного сигнала в гелевых ячейках биологического микрочипа, содержащих иммобилизационные олигонуклеотиды (для промоторов *35S* и *nos,* терминатора *ocs,* генов *gus* или *nptII),* свидетельствует о присутствии конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т.е. о трансгенности анализируемой ДНК. Низкий уровень флуоресцентных сигналов в гелевых ячейках биологического микрочипа после гибридизации, сравнимый с уровнем фоновой флуоресценции отрицательного контроля, но не выше установленного порога чувствительности в программе Imageware, указывает на отсутствие конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о нетрансгенности анализируемой ДНК.

8.3 Интерпретация результатов

8.3.1 Высокий уровень флуоресценции одной, нескольких или всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, превышающий заданный в программе Imageware [2] порог чувствительности, свидетельствует о наличии генетически модифицированных источников (ГМИ) в анализируемом продукте.

8.3.2 Низкий уровень флуоресценции всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, близкий к фоновой флуоресценции отрицательных контролей и не достигающий заданного в программе Imageware порога чувствительности, свидетельствует об отсутствии генетически модифицированных источников (ГМИ) в анализируемом продукте.

8.3.3 Высокий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо нетрансгенной ДНК свидетельствует о получении ложноположительного результата. Причиной может быть загрязнение ГМИ реактивов и (или) оборудования. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и оборудования раствором соляной кислоты **(1 моль/дм^3),** заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Полученный при повторном анализе низкий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо нетрансгенной ДНК свидетельствует о достоверном результате, который является окончательным.

8.3.4 Низкий уровень (отсутствие) флуоресцентного сигнала при использовании заведомо трансгенной ДНК свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. Причиной могут быть потеря активности одного из компонентов реакционной смеси для амПЦР или несоблюдение условий проведения амПЦР и (или) гибридизации на биологическом микрочипе. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Полученный при повторном анализе высокий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо трансгенной ДНК свидетельствует о достоверном результате, который является окончательным.

9 Оформление результатов анализа

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

10 Требования безопасности

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

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

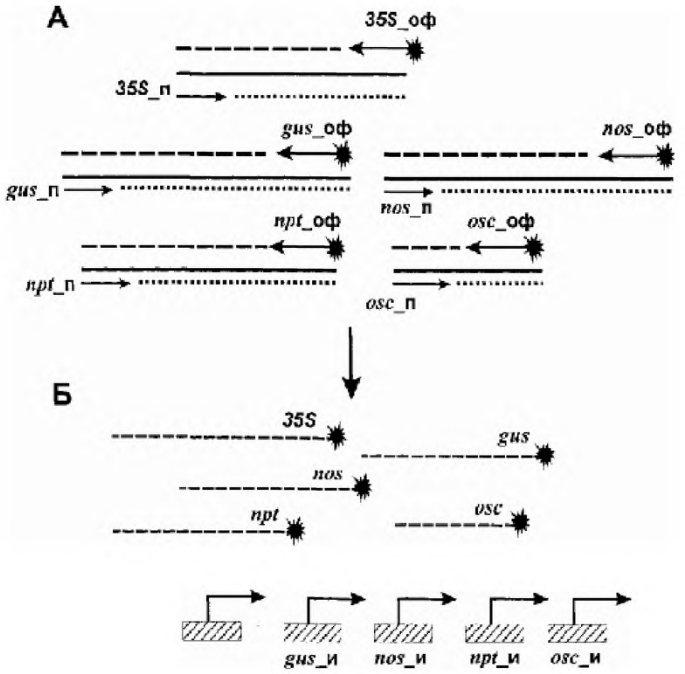
10.3 При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.019. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

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

10.5 При работе с опасными материалами и реактивами, используемыми при контроле следует соблюдать требования безопасности, предусмотренные [24], *а также нормативными документами на них.*

Приложение А
(справочное)

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения



А— амПЦР с использованием флуоресцентно-меченных праймеров (индекс **“_оф”);**

Б — гибридизация ПЦР продуктов со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на биологическом микрочипе (индекс **“_и)**

Приложение Б
(обязательное)

Пример гибридизационной картины на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР

(Гибридизационная картина на экране компьютера, полученная в результате анализа генетически модифицированного картофеля, содержащего промотор *35S*, гены *gus* и *nptII и* промотор *nos)*

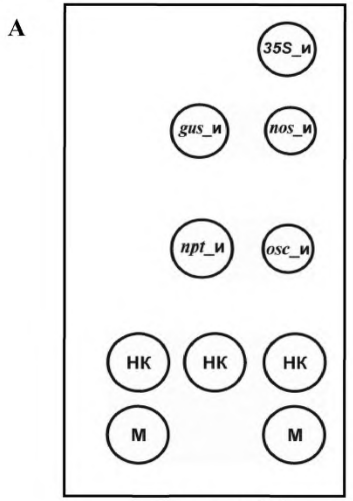


Рисунок А.1

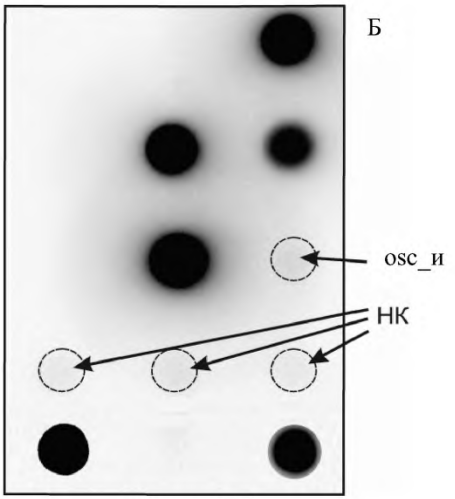


Рисунок Б.1

А— схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированного источника растительного происхождения;

Б — гибридизационная картина на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР анализируемой ДНК, содержащей промотор *35S,* гены *gus* и *nptII, а* также промотор *nos.* Пунктиром обозначены гелевые ячейки биологического микрочипа с уровнем флуоресценции, близким к фоновой, не достигающим заданного в программе Imageware порога чувствительности

Приложение В
(рекомендуемое)

Пример оформления протокола испытания
Наименование организации (испытательная лаборатория)
Протокол испытаний
№_____от "___"_____ 200__ г.

Даты: поступления на испытание "___"_____200__г.
конца испытаний "___"_____200__г.

Продукция: _____Картофель семенной

Производитель сырья или продукции _____ООО "Вымпел"

Предъявитель сырья или продукции _____"Биотест-М"

Отбор проб произведен _____ГОСТ 11856-89
(в соответствии с нормативным документом на соответствующую однородную группу сырья или продукции)
Акт отбора проб и техническое задание на испытания №_5_ от _01.12.200_г.

Испытания проведены на основании требований СТ РК* -.
Номер образца _____6/2004, 7/2004, 8/2004 и 9/2004___
Характеристика испытуемого образца (маркировка, вид и состояние упаковки, этикетки, штриховка) ___-

.

Маркировка _____-

.

Годен до _____ Штриховой код _____.

Результаты испытаний

Номер образца	Трансгенные последовательности				
	35S	*gus*	*nos*	*nptII*	*ocs*
6/2004	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
7/2004	Присутствует	Присутствует	Отсутствует	Присутствует	Присутствует
8/2004	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
9/2004	Присутствует	Отсутствует	Присутствует	Отсутствует	Отсутствует

* Стандарт находится в разработке

Результат анализа: В образцах 7/2004 и 9/2004 обнаружены следующие трансгенные компоненты: в образце № 7/2004 обнаружены гомологи генов *gus* и *nptII,* промоторы *35S, osc,* а в образце № 9/2004 обнаружены промоторы *35S* и *nos*. В образцах № 6/2004 и 8/2004 трансгенные компоненты не обнаружены. Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ в образцах № 6/2004, 7/2004 и 8/2004 отсутствует, а в образце № 9/2004 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]	Закон Республики Казахстан	О качестве и безопасности пищевых продуктов
[2]	Центр биологических микрочипов ИМБ РАН	Компьютерная программа “Imageware” для анализа изображений, полученных с помощью “Чипдетектора-03”
[3]	ТУ 9443-001-02699501-2003	Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов “Чипдетектор-03”
[4]	ТУ 9642-001-4648062-98	Амплификатор “Терцик МС-2”
[5]	ТУ 42-619-61	Термостат суховоздушный ТВЗ-25
[6]	Корпорация “Эппендорф”, кат. № 5425000.014	Микроцентрифуга настольная 5415С, 13000 мин$^{-1}$
[7]	Корпорация “Хеликон”, кат. № MSH-300	Мешалка магнитная с подогревом
[8]	Корпорация “Хеликон”, кат. № CV-1500	Аппарат для встряхивания (центрифуга-“Вортекс”)
[9]	Корпорация “Хеликон”, кат. № RP-30 и RP-80	Штативы под микроцентрифужные пробирки
[10]	Корпорация “Хеликон”, кат. № FA 104; FA 108; FA 111; FA 113N	Наконечники с фильтром для микропипеток
[11]	ТУ 6-09-11-1721-83	Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль дигидрат
[12]	ТУ 6-09-4292-76	Трис (оксиметил) аминометан [$NH_2C(CH2OH)_3$]
[13]	Корпорация “Сигма Алдрич” (“Sigma”), кат. № L-6026	Додецилсульфат натрия (SDS)

[14]	Корпорация “Сигма Алдрич” (“Sigma”), кат. № Д 1806	Фермент Taq-полимераза 5 Ед.акт./мм^3
[15]	Корпорация “Хеликон”, кат. № Am-038-0.5	Гуанидин тиоцианат [CH_3N_3-HSCN]
[16]	Корпорация “Хеликон”, кат. № Am-0485-01	N-[2-оксиэтил] пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [$C_8H_{17}N_2O_4SNA$]
[17]	Корпорация “Хеликон”, кат. № H-4044-0.4	Раствор смеси дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по **25 мМ** каждого
[18]	ИФР РАН	Раствор заведомо трансгенной ДНК около 100 нг/мм^3 или 10^6 копий/мм^3
[19]	ИФР РАН	Раствор заведомо нетрансгенной ДНК около 100 нг/мм^3 или 10^6 копий/мм^3
[20]	ТУ 46-22-603-75	Баня водяная с электрическим или огневым подогревом
[21]	Центр биологических микрочипов ИМБ РАН	Раствор водный праймеров “ПР-1”
[22]	Центр биологических микрочипов ИМБ РАН	Микрочипы гелевые с иммобилизованными олигонуклеотидами
[23]	Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения	Государственный комитет Санэпиднадзора Российской Федерации; № 06-19/52-17 от 15.06.95
[24]	СП 1.2.006-93	Санитарные правила по безопасности работ с микроорганизмами. Часть 1.
[25]	ООО “Биоконтроль”	Компьютерная программа “Био-1”
[26]	ООО “Биоконтроль”	Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции “Евробио-ВТО”

УДК 663/.664:543.06:006.354

МКС	КГС	КГС
65.140	Н11	С 11- 13
65.160	Н13	С21
67.060	Н17	С23-С25
67.080	Н23	С32-С36
67.100	Н27	С41-С45
67.120	Н31-Н34	С52
67.140	Н36	
67.140.30	Н41-Н43	
67.160	Н51-Н56	
67.180	Н62	
67.190	Н65	
67.200	Н68	
67.220	Н72-Н74	
67.230	Н81	
	Н97	

Ключевые слова: идентификация, сырье и продукты пищевые, генетически модифицированные источники, асимметричная мультиплексная полимеразная цепная реакция, биологический микрочип, гибридизация, праймер, олигонуклеотиды, последовательность ДНК, нетрансгенная ДНК, трансгенная ДНК, интенсивность флуоресценции

gost.e-ecolog.ru