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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34104— 2017

КОРМА И КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ

Метод идентификации генетически модифицированных линий сои, кукурузы и рапса с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 июня 2017 г. № 51)

За принятие проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2017 г. № 593-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34104—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2017

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Условия выполнения исследований и требования безопасности 2
5 Оборудование, материалы, реагенты 3
6 Сущность метода 12
7 Отбор проб 12
8 Экстракция ДНК 12
9 Постановка ПЦР и проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real Time PCR) 13
Приложение А (справочное) Требования к ПЦР-лаборатории 19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА И КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ

Метод идентификации генетически модифицированных линий сои, кукурузы и рапса с использованием ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

Feed and feed additives. Method of identification of genetically modified events of soybean, maize and rapeseed using PCR with hybridization-fluorescence detection in real time

Дата введения — 2018—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма: фуражное зерно, продукты его переработки; растительные корма; комбикорма для продуктивных и непродуктивных животных и сырье для их производства; кормовые добавки и устанавливает метод идентификации генно-модифицированной сои (далее — ГМ сои), генно-модифицированной кукурузы (далее — ГМ кукурузы) и генно-модифицированного рапса (далее — ГМ рапса) методом полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real Time PCR).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.0.004—2015 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

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 ISO 6497—2014 Корма. Отбор проб

ГОСТ ISO 7218—2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 24760—81 Халаты медицинские женские. Технические условия

ГОСТ 25194—82 Халаты медицинские мужские. Технические условия

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

ГОСТ 31719—2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009.

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **амплификация:** Процесс, многократно увеличивающий число копий фрагмента генома какого-либо организма.

3.2 **генно-модифицированные (генно-инженерные, трансгенные) организмы**; ГМО: Организм или несколько организмов, любое неклеточное, одноклеточное или многоклеточное образование, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и/или содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинации генов.

3.3 **линия генно-модифицированного растения** (генетически модифицированная линия, ГМ линия): Потомство от одного определенного генно-инженерно-модифицированного организма.

3.4 **нуклеиновые кислоты**; НК: Макромолекулы, являющиеся носителями генетической информации или выступающие в качестве посредника при синтезе полипептидной цепи.

3.5 **нуклеотидная последовательность:** Порядок чередования нуклеотидных остатков в НК.

3.6 **отрицательный контроль ПЦР**; К–: Реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо не содержащая целевой нуклеиновый материал.

3.7 **отрицательный контроль выделения (контроль чистоты выделения)**; КВ: Контроль, прошедший все этапы выделения ДНК, но в отсутствие анализируемой пробы.

3.8 **отрицательный контрольный образец**; ОКО: Реакционная смесь, используемая вместо анализируемой пробы для контроля чистоты выделения ДНК.

3.9 **полимеразная цепная реакция**; ПЦР: Циклический ферментативный процесс, результатом которого является получение многочисленных копий определенного участка молекулы ДНК.

3.10 **положительный контроль ПЦР**; К+: Реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо содержащая целевой нуклеиновый материал.

3.11 **полимеразная цепная реакция в режиме реального времени:** Полимеразная цепная реакция, проводимая по специальной технологии, которая позволяет регистрировать накопление ПЦР-продуктов в процессе амплификации.

3.12 **ПЦР-продукт:** Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР.

3.13 **праймер:** Искусственно синтезируемая короткая последовательность нуклеотидов, комплементарная определенному участку целевой ДНК, используемая в полимеразной цепной реакции.

3.14 **промотор:** Последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, ответственная за начало транскрипции.

3.15 **пороговый цикл Ct:** Цикл амплификации, в котором кривая флуоресценции исследуемого образца пересекает линию порога (Threshold).

3.16 **терминатор:** Последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, ответственная за прекращение транскрипции.

3.17 **целевая ДНК:** Выбранная для амплификации последовательность ДНК.

3.18 **экстракция ДНК:** Обработка анализируемой пробы, высвобождающая ДНК.

3.19 **элюция:** Извлечение вещества из твердого носителя вымыванием подходящим растворителем.

4 Условия выполнения исследований и требования безопасности

4.1 Условия выполнения исследований

4.1.1 Общие требования к помещениям — по ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ИСО/МЭК 17025, ГОСТ 31719 (приложение А).

4.1.2 Требования к персоналу — по ГОСТ ISO 7218 и ГОСТ ИСО/МЭК 17025.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 В лаборатории должно быть организовано обучение персонала безопасности труда в соответствии с ГОСТ 12.0.004.

4.2.2 При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать общие требования безопасности обращения с вредными веществами, установленные ГОСТ 12.1.007.

4.2.3 Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

4.2.4 При работе с электроустановками следует соблюдать требования электробезопасности, установленные в ГОСТ 12.1.019.

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

5 Оборудование, материалы, реагенты

5.1 Общие требования к оборудованию — по ИСО/МЭК 17025.

5.2 При проведении испытаний применяют оборудование и материалы по ГОСТ 31719, с дополнением:

- бокс ламинарный, класс биологической безопасности II тип А2;
- термостат, обеспечивающий температуру нагрева до 100 °С;
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- центрифуга для микропробирок вместимостью 1,5 $см^3$, со скоростью вращения не менее 12000 об/мин;
- миницентрифуги-встряхиватели с роторами для микропробирок вместимостью 0,2; 0,6 и 1,5 $см^3$, со скоростью вращения не менее 2400 об/мин;
- микропробирки одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся вместимостью 1,5 $см^3$;
- микропробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью 0,2 $см^3$;
- одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером объемом 10 $мм^3$, 100 $мм^3$, 200 $мм^3$, 1000 $мм^3$;
- ПЦР-бокс;
- прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени*;
- халаты медицинские по ГОСТ 24760 и ГОСТ 25194;
- холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой, обеспечивающей поддержание температуры не выше минус 16 °С.

Допускается использование другого оборудования, материалов с техническими характеристиками не ниже указанных.

Допускается использование роботизированных станций для пробоподготовки, выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и раскапывания готовой многокомпонентной смеси для ПЦР.

5.3 При проведении испытаний применяют реагенты для экстракции ДНК, реагенты, праймеры и зонды для проведения ПЦР и амплификации. Для экстракции ДНК допускается использовать готовые наборы**.

5.3.1 Реагенты:

а) набор реагентов для экстракции ДНК, включающий:

1) буфер для лизирующего реагента, содержащий хаотропный агент гуанидин хлорид;

2) лизирующий реагент, содержащий протеиназу К;

3) раствор для отмывки № 1 для очистки от клеточных белков, содержащий хаотропный агент гуанидин тиоцианат;

---

* Прибор для проведения ПЦР «Rotor-Gene» 2000/3000/6000 («Corbett Research», Австралия), «Rotor Gene Q» («Qiagen», Германия). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

** Примером могут служить наборы «ДНК-СОРБ-С» (ФГБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, форма 1 ref К1-6-50/ver. 05/08/16), «Сорб-ГМО-А» и «Сорб-ГМО-Б» (ЗАО «Синтол», каталожный номер GM-503). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

4) раствор для отмывки № 2 для очистки от солей, содержащий водный раствор изопропилового спирта;

5) сорбент (25 %-ная взвесь частиц силикагеля SiO_2 размером от 20 до 50 мкм в растворе Трис-HCl молярной концентрации 5 ммоль/дм^3);

6) буфер для элюции ДНК (ТЕ-буфер) — Трис-HCl молярной концентрации 10 ммоль/дм^3; натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты молярной концентрации 1 ммоль/дм^3;

б) вода деионизированная, класса чистоты I, свободная от рибонуклеаз, дезоксирибонуклеаз, неорганических и органических примесей с удельным сопротивлением не менее 18 Мом · см;

в) ПЦР-буфер с $MgCl_2$;

г) смесь олигонуклеотидов (праймеры) по 5.3.2 или 5.3.3;

д) смесь олигонуклеотидов (зонды, меченные флуоресцентными красителями FAM и R6G) по 5.3.2 или 5.3.3;

е) раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), содержащий натриевые соли дНТФ со степенью очистки более 98 % и концентрацией каждой 2 моль/дм^3;

ж) термостабильная Taq-полимераза;

и) сертифицированные стандартные образцы ГМ линий сои, ГМ линий кукурузы или ГМ линий рапса*.

Допускается использование других реагентов с техническими характеристиками не хуже указанных.

5.3.2 Для выявления фрагментов видоспецифичной ДНК растений допускается использование наборов реагентов (готовых тест-систем), содержащих праймеры, специфичные к ДНК определенного вида растений.

5.3.3 Допускается использование синтезированных олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации ГМ линий сои, кукурузы и рапса. Список последовательностей всех используемых олигонуклеотидов приведен в таблицах 1—3, где указаны последовательности:

1) для прямых и обратных праймеров и зондов**, специфичных конкретной ГМ линии;

2) прямых и обратных праймеров и зондов, специфичных фрагменту генома растения (ген лектина для сои, ген зеина для кукурузы, ген круциферина А для рапса).

Таблица 1 — Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации ГМ линий сои

Линия ГМ сои	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
40-3-2	Целевая	40-3-2F	GCCATGTTGTTAATTTGTGCCAT
		40-3-2R	GAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGAC
		40-3-2P	FAM-CTTGAAAGATCTGCTAGAGTCAGCTTGTCAGC G-BHQ1
	Растительная	Lec40-3-2F	TCCACCCCCATCCACATTT
		Lec40-3-2R	GGCATAGAAGGTGAAGTTGAAGGA
		Lec40-3-2P	R6G-AACCGGTAGCGTTGCCAGCTTCG-BHQ1
A5547-127	Целевая	A5547F	GCTATTTGGTGGCATTTTTCCA
		A5547R	CACTGCGGCCAACTTACTTCT
		A5547P	FAM-CCGCAATGTCATACCGTCATCGTTGT-BHQ1
	Растительная	LecA5547F	CTTTCTCGCACCAATTGACA
		LecA5547R	TCAAACTCAACAGCGACGAC
		LecA5547P	R6G-CCACAAACACATGCAGGTTATCTTGG-BHQ1

* Сертифицированные стандартные образцы производства *IRMM*, Бельгия; *AOCS*, США (материалы, состоящие из высушенной гомогенизированной муки соевых бобов, рапса или кукурузы, включающих смеси ГМ и не ГМ растений соответствующих видов, содержащие от 0,1 % до 100 % генетически модифицированных материалов). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

** Маркировки в наименовании: «F» — прямой праймер, «R» — обратный праймер, «P» — зонд.

Продолжение таблицы 1

Линия ГМ сои	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
A2704-12	Целевая	A2704F	GCAAAAAAGCGGTTAGCTCCT
		A2704R	ATTCAGGCTGCGCAACTGTT
		A2704P	FAM-CGGTCCTCCGATCGCCCTTCC-BHQ1
	Растительная	LecA2704F	CACCTTTCTCGCACCAATTGACA
		LecA2704R	TCAAACTCAACAGCGACGAC
		LecA2704P	R6G-CCACAAACACATGCAGGTTATCTTGG-BHQ1
MON89788	Целевая	MON89788F	TCCCGCTCTAGCGCTTCAAT
		MON89788R	TCCCGCTCTAGCGCTTCAA
		MON89788P	FAM-CTGAAGGCGGGAAACGACAATCTG-BHQ1
	Растительная	LecMON89788F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		LecMON89788R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		LecMON89788P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
MON87701	Целевая	MON87701F	TGGTGATATGAAGATACATGCTTAGCAT
		MON87701R	CGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAA
		MON87701P	FAM-TCAGTGTTTGACACACACACTAAGCGTGCC-BHQ1
	Растительная	Lec87701F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		Lec87701R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		Lec87701P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
BPS-CV127-9	Целевая	BPSF	AACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAGAC
		BPSR	CATTCGTAGCTCGGATCGTGTAC
		BPSP	FAM–TTTGGGGAAGCTGTCCCATGCCC-BHQ1
	Растительная	LecBPSF	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		LecBPSR	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		LecBPSP	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
SYHTOH2	Целевая	SyhF	GGGAATTGGGTACCATGCC
		SyhR	TGTGTGCCATTGGTTTAGGGT
		SyhP	FAM-CCAGCATGGCCGTATCCGCAA-BHQ1
	Растительная	LecSyhF	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		LecSyhR	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		LecSyhP	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
FG72	Целевая	FG72F	AGATTTGATCGGGCTGCAGG
		FG72R	GCACGTATTGATGACCGCATTA
		FG72P	FAM- AATGTGGTTCATCCGTCTTTTTTG-BHQ1
	Растительная	LecFG72F	CTTTCTCGCACCAATTGACA
		LecFG72R	TCAAACTCAACAGCGACGAC
		LecFG72P	R6G-CCACAAACACATGCAGGTTATCTTGG-BHQ1
DP-305423	Целевая	305423F	CGTGTTCTCTTTTTGGCTAGC
		305423R	GTGACCAATGAATACATAACACAAACTA
		305423P	FAM-TGACACAAATGATTTTCATACAAAAGTCGAGA-BHQ1

Продолжение таблицы 1

Линия ГМ сои	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
DP-305423	Растительная	Lec305423F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		Lec305423R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		Lec305423P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
DP-356043	Целевая	356043F	GTCGAATAGGCTAGGTTTACGAAAAA
		356043R	TTTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAGTGT
		356043P	FAM-CTCTAGAGATCCGTCAACATGGTGGAGCAC-BHQ1
	Растительная	Lec356043F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		Lec356043R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		Lec356043P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
MON87705	Целевая	Mon87705F	TTCCCGGACATGAAGCCATTTAC
		Mon87705R	ACAACGGTGCCTTGGCCCAAAG
		Mon87705P	FAM-AAGAGACTCAGGGTGTTGTTATCACTGCGG-BHQ1
	Растительная	LecMon87705F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		LecMon87705R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		LecMon87705P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
MON87708	Целевая	Mon87708F	TCATACTCATTGCTGATCCATGTAG
		Mon87708R	AGAACAAATTAACGAAAAGACAGAACG
		Mon87708P	FAM-TCCCGGACTTTAGCTCAAAATGCATGTA-BHQ1
	Растительная	LecMon87708F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		LecMon87708R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		LecMon87708P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
MON87769	Целевая	Mon87769F	CATACTCATTGCTGATCCATGTAGATT
		Mon87769R	GCAAGTTGCTCGTGAAGTTTTG
		Mon87769P	FAM-CCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAC-BHQ1
	Растительная	LecMon87769F	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC
		LecMon87769R	GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC
		LecMon87769P	R6G-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-BHQ1
DAS-44406	Целевая	DAS-44406F	TTA TTG TTC TTG TTG TTT CCT CTT TAG G
		DAS-44406R	CCT CAA TTG CGA GCT TTC TAA TTT
		DAS-44406P	FAM- ATT CGG ACC TCC ATG ATG ACC TTA CCG TT -BHQ1
	Растительная	LecDAS-44406F	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
		LecDAS-44406R	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
		LecDAS-44406P	FAM- CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC- BHQ1
DAS-81419	Целевая	DAS 81419F	TCT AGC CTA TAT TTA GCA CTT GAT ATT CAT
		DAS 81419R	GCT TCA AGA TCC CAA CTT GCG
		DAS 81419P	FAM-ATC AAC AGG CAC CGA TGC GCA CCG- BHQ1

Окончание таблицы 1

Линия ГМ сои	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
DAS-81419	Растительная	Lec DAS 81419F	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
		LecDAS 81419R	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
		LecDAS 81419P	FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC- BHQ1
DAS-68416	Целевая	DAS 68416F	GTA CAT TAA AAA CGT CCG CAA TGT GT
		DAS 68416R	GTT TAA GAA TTA GTT CTT ACA GTT TAT TGT TAG
		DAS 68416P	FAM-TTA AGT TGTCTA AGC GTC AAT A-MGBNFQ
	Растительная	Lec DAS 68416F	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
		LecDAS 68416R	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
		LecDAS 68416P	FAM-CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC- BHQ1

Таблица 2 — Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации ГМ линий кукурузы

Линия ГМ кукурузы	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
GA21	Целевая	GA21 F	CTT ATC GTT ATG CTA TTT GCA ACT TTA GA
		GA21 R	TGG CTC GCG ATC CTC CT
		GA21 P	FAM- CAT ATA CTA ACT CAT ATC TCT TTC TCA ACA GCA GGT GGG T -BHQ1
	Растительная	Adh GA21 F	CCA GCC TCA TGG CCA AAG
		Adh GA21 R	CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG
		Adh GA21 P	R6G- CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT - BHQ1
MON810	Целевая	Mon810 F	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT
		Mon810 R	GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT
		Mon810 P	FAM- AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC -BHQ1
	Растительная	Hmg Mon810 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg Mon810 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg Mon810 P	R6G- CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA -BHQ1
MON89034	Целевая	Mon89034 F	TTC TCC ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT
		Mon89034 R	CGG TAT CTA TAA TAC CGT GGT TTT TAA A
		Mon89034 P	FAM-ATCCCCGGAAATTATGTT-MGBNFQ
	Растительная	Hmg Mon89034 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg Mon89034 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg Mon89034 P	R6G- CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA -BHQ1
NK603	Целевая	NK603 F	ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA
		NK603 R	AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T
		NK603 P	FAM- TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC -BHQ1
	Растительная	Agh NK603 F	CCA GCC TCA TGG CCA AAG
		Agh NK603 R	CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG
		Agh NK603 P	R6G- CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT -BHQ1

Продолжение таблицы 2

Линия ГМ кукурузы	Последователь-ность	Наименование	5'-3' последовательность
Bt11	Целевая	Bt11 F	GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA
		Bt11 R	TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG
		Bt11 P	FAM- AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA -BHQ1
	Растительная	Adh Bt11 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC
		Adh Bt11 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh Bt11 P	R6G- AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA -BHQ1
T25	Целевая	T25 F	ACA AGC GTG TCG TGC TCC AC
		T25 R	GAC ATG ATA CTC CTT CCA CCG
		T25 P	FAM- TCA TTG AGT CGT TCC GCC ATT GTC G -BHQ1
	Растительная	Adh T25 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CCT
		Adh T25 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh T25 P	R6G- AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA -BHQ1
MIR604	Целевая	MIR604 F	GCG CAC GCA ATT CAA CAG
		MIR604 R	GGT CAT AAC GTG ACT CCC TTA ATT CT
		MIR604 P	FAM- AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-BHQ1
	Растительная	Adh MIR604 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC
		Adh MIR604 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh MIR604 P	R6G- AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA -BHQ1
MON 88017	Целевая	MON 88017 F	GAG CAG GAC CTG CAG AAG CT
		MON 88017 R	TCC GGA GTT GAC CAT CCA
		MON 88017 P	FAM- TCC CGC CTT CAG TTT AAA CAG AGT CGG GT -BHQ1
	Растительная	Hmg MON 88017 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg MON 88017 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg MON 88017 P	R6G- CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA -BHQ1
3272	Целевая	3272 F	TCA TCA GAC CAG ATT CTC TTT TAT GG
		3272 R	CGT TTC CCG CCT TCA GTT TA
		3272 P	FAM- ACT GCT GAC GCG GCC AAA CAC TG -BHQ1
	Растительная	Adh 3272 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC
		Adh 3272 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh 3272 P	R6G- AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA -BHQ1
MIR162	Целевая	MIR162 F	GCG CGG TGT CAT CTA TGT TAC TAG
		MIR162 R	TGC CTT ATC TGT TGC CTT CAG A
		MIR162 P	FAM- TCT AGA CAA TTC AGT ACA TTA AAA ACG TCC GCC A -BHQ1
	Растительная	Adh MIR162 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC
		Adh MIR162 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh MIR162 P	R6G- AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA -BHQ1

Продолжение таблицы 2

Линия ГМ кукурузы	Последователь-ность	Наименование	5'-3' последовательность
5307	Целевая	5307 F	CAT GGC CGT ATC CGC AAT GTG
		5307 R	TGC ACC CTT TGC CAG TGG
		5307 P	FAM-ACC ACA ATA TAC CCT CTT CCC TGG GCC AG-BHQ1
	Растительная	Adh 5307 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC
		Adh 5307 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh 5307 P	R6G -AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-BHQ1
Bt176	Целевая	Bt176 F	GGC CGT GAA CGA GCT GTT
		Bt176 R	GGG AAG AAG CCT ACA TGT TTT CTA A
		Bt176 P	FAM-AGC AAC CAG ATC GGC CGA CAC C-BHQ1
	Растительная	Adh Bt176 F	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC
		Adh Bt176 R	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
		Adh Bt176 P	R6G-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-BHQ1
MON 98140	Целевая	MON 98140 F	GTG TGT ATG TCT CTT TGC TTG GTC TT
		MON 98140 R	GAT TGT CGT TTC CCG CCT TC
		MON 98140 P	FAM-CTC TAT CGA TCC CCC TCT TTG ATA GTT TAA ACT-BHQ1
	Растительная	Hmg 98140 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg 98140 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg 98140 P	R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1
MON87460	Целевая	Mon87460 F	CAC GTT GAA GGA AAA TGG ATT G
		Mon87460 R	TCG CGA TCC TCC TCA AAG AC
		Mon87460 P	FAM-AGG GAG TAT GTA GAT AAA TTT TCA AAG CGT TAG ACG GC-BHQ1
	Растительная	Hmg Mon87460 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg Mon87460 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg Mon87460 P	R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1
MON863	Целевая	Mon863 F	GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C
		Mon863 R	TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT
		Mon863 P	FAM-TGA ACA CCC ATC CGA ACA AGT AGG GTC A-BHQ1
	Растительная	Adh Mon863 F	CCA GCC TCA TGG CCA AAG
		Adh Mon863 R	CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG
		Adh Mon863 P	R6G-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT-BHQ1
TC1507	Целевая	TC1507 F	TAG TCT TCG GCC AGA ATG G
		TC1507 R	CTT TGC CAA GAT CAA GCG
		TC1507 P	FAM-TAA CTC AAG GCC CTC ACT CCG-BHQ1
	Растительная	Hmg TC1507 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg TC1507 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg TC1507 P	R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1

Окончание таблицы 2

Линия ГМ кукурузы	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
59122	Целевая	59122 F	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC
		59122 R	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG
		59122 P	FAM-TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA-BHQ1
	Растительная	Hmg 59122 F	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg 59122 R	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg 59122 P	R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1
LY038	Целевая	LY038 F	TGG GTT CAG TCT GCG AAT GTT
		LY038 R	AGG AAT TCG ATA TCA AGC TTA TCG A
		LY038 P	FAM-CGA GCG GAG TTT ATG GGT CGA CGG-BHQ1
	Растительная	Hmg LY038 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg LY038 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg LY038 P	R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1
DAS-40278-9	Целевая	DAS40278 F	CAC GAA CCA TTG AGT TAC AAT C
		DAS40278 R	TGG TTC ATT GTA TTC TGG CTT TG
		DAS40278 P	FAM-CGT AGC TAA CCT TCA TTG TAT TCC G-BHQ1
	Растительная	Hmg 40278 F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA
		Hmg 40278 R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T
		Hmg 40278 P	R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1

Таблица 3 — Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации ГМ линий рапса

Линия ГМ рапса	Последовательность	Наименование	5'-3' последовательность
GT73	Целевая	RT73-F	CCATATTGACCATCATACTCATTGCT
		RF3-R	GCTTATACGAAGGCAAGAAAAGGA
		RT73-Z	FAM-TTCCCGGACATGAAGATCATCCTCCTT-BHQ1
GT73	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	CCGTCGTTGTAGAACCATTGG
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
MON88302	Целевая	MON88302-F	TCCTTGAACCTTATTTTATAGTGCACA
		MON88302-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		MON88302-Z	FAM-TAGTCATCATGTTGTACCACTTCAAACACT-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	CCGTCGTTGTAGAACCATTGG
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
MS1	Целевая	Ms1-F	ACGCTGCGGACATCTACATT
		MS1-R	CTAGATCGGAAGCTGAAGATGG
		MS1-Z	FAM-CTCATTGCTGATCCACCTAGCCGACTT-BHQ1

Окончание таблицы 3

Линия ГМ рапса	Последователь-ность	Наименование	5'-3' последовательность
MS1	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
MS8	Целевая	MS8-F	GTTAGAAAAAGTAAACAATTAATATAGCCGG
		MS8-R	GGAGGGTGTTTTTGGTTATC
		MS8-Z	FAM-AATATAATCGACGGATCCCCGGGAATTC-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
T45	Целевая	T45-F	CAATGGACACATGAATTATGC
		T45-R	GACTCTGTATGAACTGTTCGC
		T45-Z	FAM-TAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGT-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
RF1	Целевая	RF1-F	CTAAGGGAGGTCAAGATGTAGC
		RF1-R	CGGGCCTAACTTTTGGTGTG
		RF1-Z	FAM-CTCATCATCCTCACCCAGTCAGCATCA-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
RF2	Целевая	RF2-F	GGGTGAGACAATATATCGACG
		RF2-R	GGGCATCGCACCGGTGAG
		RF2-Z	FAM-CACCGGCCAAATTCGCTCTTAGCCGT-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
RF3	Целевая	RF3-F	CATAAAGGAAGATGGAGACTTGAG
		RF3-R	AGCATTTAGCATGTACCATCAGACA
		RF3-Z	FAM-CGCACGCTTATCGACCATAAGCCCA-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1
Topas 19/2	Целевая	TOPAS19/2-F	GTTGCGGTTCTGTCAGTTCC
		TOPAS19/2-R	CGACCGGCGCTGATATATGA
		TOPAS19/2-Z	FAM-TCCCGCGTCATCGGCGG-BHQ1
	Растительная	Rape-cruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT
		Rape-cruA-R	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA
		Rape-cruA-Z	R6G-AGTCCTTATGTGCTCCACTTTCTGGTGCA-BHQ1

6 Сущность метода

6.1 Сущность метода идентификации ГМ линий сои, кукурузы и рапса методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real Time PCR) заключается в проведении двух независимых ПЦР в одной пробирке с использованием специфичных праймеров и зондов, меченных флуоресцентными красителями, с целью выявления участка видоспецифичной ДНК растений (сои, кукурузы или рапса) и части генно-инженерной конструкции, специфичной для генома тестируемой генетически модифицированной линии.

6.2 Метод состоит из следующих этапов:

- экстракция и очистка ДНК: на данном этапе осуществляется лизис клеток с последующей очисткой ДНК от балластных веществ (белков, полисахаридов и других соединений);
- ПЦР с использованием специфических праймеров и зондов, меченных флуоресцентным красителем. На данном этапе осуществляется накопление копий целевого участка ДНК и детекция ПЦР-продуктов в режиме «реального времени»;
- анализ и интерпретация результатов происходит на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флюоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией на графике зависимости интенсивности флюоресценции от количества циклов, что соответствует значениям порогового цикла Ct.

7 Отбор проб

Общие правила отбора проб для испытаний должны соблюдаться в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 6497.

8 Экстракция ДНК

8.1 Экстракцию ДНК из анализируемой пробы осуществляют с использованием набора реагентов для экстракции ДНК сорбционным методом по 5.3 или иным методом, позволяющим получить достаточный объем ДНК для последующих исследований. Объем ДНК, необходимый для проведения исследований, вычисляют по формулам:

$$V_и = 10 \cdot N, \quad (1)$$

где $V_и$ — объем ДНК, необходимый для проведения идентификации линий;

N — количество идентифицируемых линий;

$$V_к = 10 \cdot 2N, \quad (2)$$

где $V_к$ — объем ДНК, необходимый для проведения количественного анализа.

8.2 Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки № 1 (если они хранились при температуре от 2 °С до 8 °С) прогревают на поверхности твердотельного термостата при температуре от 60 °С до 64 °С до полного растворения кристаллов.

8.3 Отбирают необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 см^3 (включая отрицательный контроль выделения). В пробирки вносят анализируемые пробы. В пробирку отрицательного контроля выделения ДНК вносят 100 мм^3 ОКО.

8.4 Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером вносят в каждую пробирку по 400 мм^3 буфера для лизирующего реагента и по 17 мм^3 лизирующего реагента. Тщательно перемешивают содержимое пробирок на встряхивателе в течение 10 с.

8.5 Пробирки инкубируют в термостате при температуре 64 °С в течение 1 ч, периодически встряхивая на встряхивателе (пять раз через каждые 10—12 мин).

8.6 Нерастворенные частицы анализируемой пробы осаждают центрифугированием при 12—14 тыс. об/мин в течение 5 мин.

8.7 Надосадочную жидкость в объеме 200—350 мм^3 очень аккуратно (так, чтобы не попали взвешенные частицы и капли жира) отбирают отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами и переносят в новые пробирки.

8.8 Пробирки с надосадочной жидкостью прогревают в течение 5 мин в термостате при температуре 64 °С, перемешивают содержимое пробирок и центрифугируют в течение 5 с при 5 тыс. об/мин для сброса капель с крышки пробирки.

8.9 В каждую пробирку отдельным наконечником добавляют по 25 мм^3 сорбента, предварительно помещенного во встряхиватель для получения однородной суспензии. Содержимое пробирок перемешивают на встряхивателе и инкубируют при комнатной температуре в течение 10—15 мин, перемешивая через каждые 2 мин. Сорбент осаждают центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость удаляют, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.

8.10 В пробирки добавляют по 300 мм^3 раствора для отмывки № 1. Перемешивают на встряхивателе до полного ресуспендирования сорбента. Сорбент осаждают центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 с. Удаляют надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.

8.11 Процедуру отмывки повторяют дважды, используя по 500 мм^3 раствора для отмывки № 2, и центрифугируют в течение 30 с при 7 тыс. об/мин, удаляют надосадочную жидкость полностью.

8.12 Пробирки с отмытым сорбентом помещают в термостат при температуре 64 °С на 10 мин для подсушивания сорбента. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

8.13 В пробирки добавляют по 50 мм^3 буфера для элюции ДНК и перемешивают на встряхивателе. Помещают в термостат при температуре 64 °С на 5 мин и периодически (один раз в минуту) встряхивают на встряхивателе. Пробирки центрифугируют при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин.

8.14 Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК, которую затем используют для постановки ПЦР и проведения амплификации. Очищенную ДНК можно хранить в течение одной недели при температуре от 2 °С до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С. Для этого рекомендуется перенести надосадочную жидкость в чистую микропробирку.

9 Постановка ПЦР и проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real Time PCR)

9.1 Приготовление реакционной ПЦР-смеси

Для приготовления реакционной ПЦР-смеси для определения генетически модифицированной линии сои, кукурузы или рапса берут 1 мм^3 деионизированной воды, по 1 мм^3 каждого соответствующего праймера с маркировкой «F» по 5.3.2 концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ моль/дм^3, по 1 мм^3 каждого праймера с маркировкой «R» по 5.3.2 концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ моль/дм^3, по 1 мм^3 каждого зонда с маркировкой «Р» по 5.3.2 концентрацией $3 \cdot 10^{-6}$ моль/дм^3, 3 мм^3 раствора дНТФ и смешивают в пробирке вместимостью 1,5 см^3. Срок хранения готовой ПЦР-смеси при температуре не выше минус 18 °С — не более 12 мес.

9.2 Постановка ПЦР

9.2.1 ДНК, экстрагированную из анализируемой пробы (включая стандартные образцы), испытывают не менее чем в двух повторностях.

9.2.2 Для проведения ПЦР в одной пробирке смешивают 10 мм^3 ПЦР-смеси по 9.1, к которой добавляют 5 мм^3 ПЦР-буфера и 0,5 мм^3 термостабильной Taq полимеразы. Смесь перемешивают на встряхивателе, осаждая кратковременным центрифугированием.

9.2.3 Вносят по 15 мм^3 смеси, полученной по 9.2.2, в микропробирку вместимостью 0,2 см^3, затем, используя наконечник с аэрозольным барьером, добавляют в нее 10 мм^3 ДНК, полученной из анализируемой пробы (ДНК-проба) в соответствии с разделом 8. Общий объем реакционной смеси — 25 мм^3.

Примечание — Необходимо избегать попадания сорбента в реакционную смесь.

9.3 Контрольные реакции амплификации:

- отрицательный контроль ПЦР (К–) — вместо ДНК-пробы в микропробирку с 15 мм^3 смеси по 9.2.2 вносят 10 мм^3 ТЕ-буфера;
- положительный контроль ПЦР (К+) — вместо ДНК-пробы в микропробирку с 15 мм^3 смеси по 9.2.2 вносят 10 мм^3 1 %-ного стандартного образца состава ГМ сои, ГМ кукурузы или ГМ рапса.

9.4 Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Программируют прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Программы амплификации для идентификации линий ГМ сои, кукурузы и рапса различаются для разных ГМ линий и приведены в таблицах 4—11.

Программа амплификации для идентификации ГМ сои линий 40-3-2, А5547-127, А2704-12 приведена в таблице 4.

Таблица 4 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий сои 40-3-2, A5547-127, A2704-12

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Удерживание	95 °С	15 мин	1	—
Циклирование	95 °С	15 с	45	—
	60 °С	30 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow
	72 °С	30 с	—	—

Программа амплификации для идентификации ГМ сои линий MON87701, BPS-CV127-9, FG72 приведена в таблице 5.

Таблица 5 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий сои MON87701, BPS-CV127-9, FG72

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	15 мин	1	—
Cycling 1/ Циклирование 1	95 °С	10 с	10	—
	60 °С	20 с		—
	72 °С	10 с		—
Cycling 2/ Циклирование 2	95 °С	10 с	35	—
	55 °С	20 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow
	72 °С	10 с		—

Программа амплификации для идентификации ГМ сои линий MON89788, SYHTOH2, DP-305423, DP-356043, MON87705, MON87708, MON87769 приведена в таблице 6.

Таблица 6 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий сои MON89788, SYHTOH2, DP-305423, DP-356043, MON87705, MON87708, MON87769

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	15 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	45	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Программа амплификации для идентификации ГМ сои линии DAS-44406, DAS-81419 приведена в таблице 7.

Таблица 7 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий сои DAS-44406, DAS-81419

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	10 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	40	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Программа амплификации для идентификации ГМ сои линии DAS-68416 приведена в таблице 8.

Таблица 8 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий сои DAS-68416

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	10 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	45	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Программа амплификации для идентификации ГМ кукурузы линий MON98140, MIR162, 5307, Bt176, MIR604, 3272 приведена в таблице 9.

Таблица 9 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий кукурузы MON98140, MIR162, 5307, Bt176, MIR604, 3272

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	10 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	40	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Программа амплификации для идентификации ГМ кукурузы линий TC1507, MON87460, LY038, DAS40278-9, MON89034, MON810, NK603, T25, GA21, MON863, MON88017 приведена в таблице 10.

Таблица 10 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий кукурузы TC1507, MON87460, LY038, DAS40278-9, MON89034, MON810, NK603, T25, GA21, MON863, MON88017

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	10 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	45	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Программа амплификации для идентификации ГМ кукурузы линий 59122, Bt11. приведена в таблице 11.

Таблица 11 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий кукурузы 59122, Bt11

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	10 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	50	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Программа амплификации для идентификации ГМ рапса линий GT73, MON88302, RF2, MS1, MS8, T45, RF1, RF3, Topas19/2 приведена в таблице 12.

Таблица 12 — Программа амплификации для идентификации ГМ линий рапса линий GT73, MON88302, RF2, MS1, MS8, T45, RF1, RF3, Topas19/2

Стадия	Температура	Время	Количество циклов	Детекция
Hold/Удержание температуры	95 °С	15 мин	1	—
Cycling/ Циклирование	95 °С	15 с	40	—
	60 °С	60 с		По каналам FAM/Green, JOE/Yellow

Детекцию флуоресцентного сигнала проводят на каналах FAM и JOE. По каналу FAM регистрируют уровень флуоресценции участка части генно-инженерной конструкции, специфичной для генома тестируемой генетически модифицированной линии, по каналу JOE — для эндогенной ДНК ГМ сои, ГМ кукурузы, ГМ рапса. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют с использованием программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме реального времени (Real Time PCR).

9.5 Учет и интерпретация результатов

9.5.1 Полученные в ходе испытания данные (кривые накопления флуоресцентного сигнала) анализируют по нескольким каналам детекции с использованием программного обеспечения прибора.

9.5.2 Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией на графике зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов, что соответствует значению порогового цикла Ct.

9.5.3 Учет результатов испытания следует начинать с результатов амплификации ДНК контрольных образцов в соответствии с таблицами оценки результатов контрольных реакций (таблицы 8—11). Для положительного контроля ПЦР в таблицах результатов по каналам FAM/Green и JOE/Yellow должны присутствовать значения порогового цикла Ct соответствующих значений в зависимости от программы амплификации. Для отрицательного контроля экстракции и отрицательного контроля ПЦР значения порогового цикла Ct по всем каналам должны отсутствовать. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР (К+) или превышение граничного значения Ct, указанного в таблице, может свидетельствовать об ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести этап ПЦР повторно.

Таблица 13 — Оценка результатов контролей для таблиц 4, 6, 8, 10

Контроли	Контролируемый этап испытаний	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
В–	Экстракция ДНК	Нет значений	Нет значений
К–	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	≤ 31	≤ 31
Проба		≤ 37	≤ 35

В образце обнаружена ДНК сои/кукурузы, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла Ct ≤ 35 (таблица 13). При получении значения Ct> 35 по каналу JOE/Yellow для анализируемой пробы требуется повторное испытание данной пробы, начиная с первого этапа испытаний (экстракция ДНК). При повторном получении аналогичного результата образец считают не подлежащим испытанию из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы/сои.

ДНК ГМ линии считают обнаруженной, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла Ct ≤ 37.

Таблица 14 — Оценка результатов контролей для таблиц 5, 7, 9

Контроли	Контролируемый этап испытаний	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
В–	Экстракция ДНК	Нет значений	Нет значений
К–	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	≤ 21	≤ 21
Проба		≤ 27	≤ 25

В образце обнаружена ДНК сои/кукурузы, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла Ct ≤25 (таблица 14). При получении значения Ct >25 по каналу JOE/Yellow для анализируемой пробы требуется повторное испытание данной пробы, начиная с первого этапа испытаний (экстракция ДНК). При повторном получении аналогичного результата образец считают не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы/сои.

ДНК ГМ линии обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла Ct ≤27.

Таблица 15 — Оценка результатов контролей для таблицы 11

Контроли	Контролируемый этап испытаний	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
В–	Экстракция ДНК	Нет значений	Нет значений
К–	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	≤ 35	≤ 35
Проба		≤ 40	≤ 37

В образце обнаружена ДНК кукурузы, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла Ct ≤37 (таблица 15). При получении значения Ct > 37 по каналу JOE/Yellow для анализируемой пробы требуется повторное испытание данной пробы, начиная с первого этапа испытаний (экстракция ДНК). При повторном получении аналогичного результата образец считают не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК кукурузы.

ДНК ГМ линии обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла Ct ≤ 40.

Таблица 16 — Оценка результатов контролей для таблицы 12

Контроли	Контролируемый этап испытаний	Значение Ct по каналу	
		FAM/Green	JOE/Yellow
В–	Экстракция ДНК	Нет значений	Нет значений
К–	ПЦР	Нет значений	Нет значений
К+	ПЦР	≤ 31	≤ 31
Проба		≤ 37	≤ 37

В образце обнаружена ДНК рапса, если для данной пробы в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла Ct ≤37 (таблица 16). При получении значения Ct> 37 по каналу JOE/Yellow для анализируемой пробы требуется повторное испытание данной пробы, начиная

с первого этапа испытаний (экстракция ДНК). При повторном получении аналогичного результата образец считают не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем ДНК рапса.

ДНК ГМ линии обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу FAM/Green определено значение порогового цикла Ct ≤ 37.

9.5.4 Проверка условий достоверности испытаний

9.5.4.1 Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР (К+) или превышение граничных значений Ct, указанных в таблицах 13—16, может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации и о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В таком случае необходимо провести этап ПЦР повторно.

9.5.4.2 Появление любого значения Ct в таблице результатов для отрицательного контроля экстракции (на любом из каналов) и для отрицательного контроля ПЦР (на любом из каналов) свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов. В этом случае результаты анализа по всем пробам считаются недействительными. Требуется повторить ПЦР-исследование всех проб, начиная с этапа экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации.

9.5.4.3 При получении значения Ct в таблице результатов по каналам Yellow и/или Green для анализируемой пробы более указанных пороговых значений Ct требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции ДНК. При повторном получении аналогичного результата образец считают не подлежащим анализу из-за низкого содержания в нем растительной ДНК и/или ДНК ГМ линии.

Приложение А
(справочное)

Требования к ПЦР-лаборатории

А.1 ПЦР-лаборатория должна быть разделена на зоны (отдельные комнаты или помещения) для каждой из стадий ПЦР-диагностики.

А.2 Рабочая зона ПЦР-лаборатории в соответствии с этапами ПЦР-исследования должна включать следующий минимальный набор изолированных помещений:

- приема и регистрации лабораторной пробы;
- первичной обработки лабораторной пробы, подготовки анализируемой пробы (I зона, отдельный ламинар);
- выделения НК из анализируемой пробы (I зона, отдельный ламинар).

Примечание — Помещения, где проводят работы по выделению и амплификации НК, располагают как можно дальше от помещения для детекции и учета результатов ПЦР с целью исключения движения воздушного потока и предотвращения контаминации продуктами амплификации (ампликонов), поскольку в процессе ПЦР фрагменты ДНК накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации;

- приготовления реакционных смесей, постановки ПЦР (II зона);
- гибридизационно-флюоресцентной детекции и учета результатов испытания методом Real Time PCR (III зона).

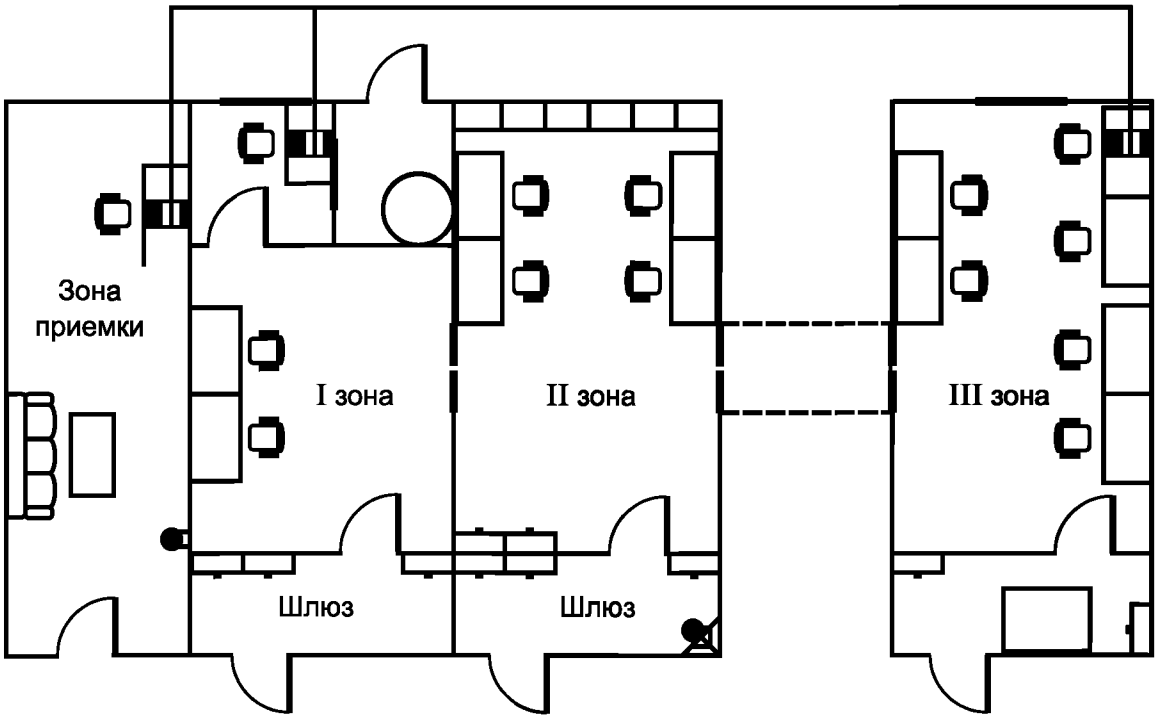


Рисунок А.1 — Схема ПЦР-лаборатории

А.3 Работа в ПЦР-лаборатории должна быть организована в одном направлении: от зон выделения и амплификации НК к зоне детекции и учета результатов ПЦР. В разных зонах лаборатории должны работать разные сотрудники.

А.4 Не допускается выполнение ПЦР-исследований в помещениях для проведения работ другими лабораторными и генно-инженерными методами (клонирование, секвенирование, рестрикционный анализ).

Все работы по подготовке испытуемых проб и выделению НК проводят в ламинарном боксе II, III классов защиты.

А.5 Каждая рабочая зона должна иметь свой набор лабораторной мебели, оборудования, реагентов, автоматических пипеток, расходных материалов, лабораторной посуды, защитной одежды, обуви, уборочного инвентаря и

др. Имущество должно иметь маркировку, использование его в других помещениях или для проведения других работ запрещено.

А.6 Для проведения ПЦР-исследований необходимо использовать только одноразовые микропробирки и наконечники. Для предотвращения аэрозольного загрязнения автоматических пипеток используют наконечники с антиаэрозольным фильтром. Пробирки и наконечники для автоматических пипеток используют однократно. При переходе от одной пробы к другой обязательно меняют наконечники с целью предотвращения перекрестной контаминации в процессе выделения ДНК, РНК или при раскапывании реакционной смеси.

А.7 Работы по подготовке реакционной смеси для ПЦР, внесению выделенных НК в ПЦР-смесь проводят в ПЦР-боксах, оснащенных ультрафиолетовыми лампами.

Регулярно следует проводить мониторинг помещений, оборудования, рабочих поверхностей, дверных ручек на наличие продуктов амплификации.

УДК 636.086.15:636.086:006.354 МКС 65 120

Ключевые слова: корма и кормовые добавки, полимеразная цепная реакция, амплификация, праймеры, зонды, генно-модифицированная соя, генно-модифицированная кукуруза, генно-модифицированный рапс, экстракция ДНК, постановка ПЦР и проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real Time PCR)

БЗ 8—2017/183

Редактор *Л.И. Нахимова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 03.07.2017. Подписано в печать 27.07.2017. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,51. Тираж 23 экз. Зак. 1228.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru