Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.2.3309—15

Издание официальное

Москва • 2015

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.2.3309—15

ББК 51.23
М54

М54 **Методы** идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—15 с.

ISBN 978—5—7508—1419—0

1. Разработаны ФГБНУ «НИИ питания» (В. А. Тутельян, Н. В. Тышко, Э. О. Садыкова, А. К. Голомидова); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. Ю. Попова, И. В. Брагина); Российской академией наук (Г. Г. Онищенко); Институтом биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН (К. Г. Скрябин, Б. Б. Кузнецов, М. С. Сухачева, И. В. Яковлева); МГУ им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 2 ноября 2015 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

ISBN 978—5—7508—1419—0

© Роспотребнадзор, 2015
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

Содержание

I. Область применения 4
II. Методы количественного определения линий ГМ сои 4
III. Методы количественного определения линий ГМ кукурузы 7
IV. Метод приготовления растворов стандартных образцов для построения калибровочной прямой 11
V. Правила оформления протокола исследований 14

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
2 ноября 2015 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах

Методические указания МУК 4.2.3309—15

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) определяют методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов (далее – ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и носят рекомендательный характер.

1.2. В настоящих МУК представлены методы, направленные на идентификацию и количественное определение рекомбинантной ДНК, характерной для уникальных трансформационных событий, для осуществления окончательной идентификации новых линий ГМО растительного происхождения.

1.3. Настоящие МУК предназначены для использования лабораториями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также другими испытательными лабораториями, аккредитованными в установленном порядке на проведение исследований продовольственного сырья и пищевых продуктов.

II. Методы количественного определения линий ГМ сои

2.1. Метод количественного определения сои линии FG72.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез лектина (*lectin1*), присущего для всех линий сои, и

области ДНК, специфичной для трансформационного события FG72 на границе генома сои и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ сои FG72 (кат. номер AOCS 0610-A3) – 99,9 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0707-A6).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК сои FG72:

MAE071 5'- AGA TTT GAT CGG GCT GCA GG-3'

SHA097 5'- GCA CGT ATT GAT GAC CGC ATT A-3'

TM325 FAM-5'- AAT GTG GTT CAT CCG TCT T-3'-MGBNFQ

Праймеры для идентификации ДНК сои (*lectin1*):

KVM164 5'- CTTTCTCGCACCAATTGACA-3'

KVM165 5'- TCA AAC TCA ACA GCG ACG AC-3'

TM021 VIC -5'- CCA CAA ACA CAT GCA GGT TAT CTT GG-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК сои FG72

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMAE071 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерSHA097 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Зонд TM325 (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК сои (*lectin1*)

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерKVM164 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерKVM165 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Зонд TM021 (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °С	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °С	15 с	нет	40
	60 °С	1 мин	да (Green, Yellow)	

2.2. Метод количественного определения сои линии SYHT0H2.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез лектина (*lectin1*), присущего для всех линий сои, и области ДНК, специфичной для трансформационного события SYHT0H2 на границе генома сои и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ сои SYHT0H2 (кат. номер AOCS 0411-D) – 99,9 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0411-B).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК сои SYHT0H2:

FE08316 forward primer 5'-GGGAATTGGGTACCATGCC-3'
FE08317 reverse primer5'-TGTGTGCCATTGGTTTAGGGT-3'
FE08318 probeFAM-5'-CCAGCATGGCCGTATCCGCAA-3'-BHQ

Праймеры для идентификации ДНК сои (*lectin1*):

Lecfor2 5'-CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC-3'
GMO3-126 Rev 5'-GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC -3'
Lec probe FAM-5'-CTTCACCTTCTATGCCCCTGACAC-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК сои SYHT0H2

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерFE08316 forwardprime (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	Праймер FE08317 reverse primer(5 пкмоль/мкл)	2,50
4	FE08318 probe(5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК сои (*lectin1*)

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерLecfor2(5 пкмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерGMO3-126 Rev (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Lec probe(5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °С	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °С	15 с	нет	45
	60 °С	60 с	да (Green)	

III. Методы количественного определения линий ГМ кукурузы

3.1. Метод количественного определения кукурузы линии MON89034.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена *hmgA*, присущего для всех линий кукурузы, и области ДНК, специфичной для трансформационного события MON89034 на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ кукурузы MON89034 (кат. номер AOCS 0906-E) – 99,4 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0906-A).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК кукурузы MON89034:

MON 89034 primer 1 5'-TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT-3'
MON 89034 primer 2 5'-CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA-3'
MON 89034 (Probe) FAM-5'-ATCCCCGGAAATTATGTT3'-MGBNFQ

Праймеры для идентификации ДНК кукурузы (*hmgA*):
hmg primer 1 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'
hmg primer 2 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'
hmg (Probe) FAM-5'-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК кукурузы MON89034

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMON 89034 primer 1 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	Праймер2MON 89034 primer 2 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	ЗондMON 89034 (Probe) (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деионизированная	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК кукурузы

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	Праймерhmgprimer 1 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	Праймерhmgprimer 2 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Зонд hmg (Probe) (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деионизированная	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °С	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °С	15 с	нет	45
	60 °С	60 с	да (Green)	

3.2. Метод количественного определения кукурузы линии 5307.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1*(adhl 1)*, присущей для всех линий кукурузы, и области ДНК, специфичной для трансформационного события 5307 на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ кукурузы 5307 (кат. номер AOCS 0411-D) – 99,88 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0411-C).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК кукурузы 5307:
5307i3' forward primer5'-CAT GGC CGT ATC CGC AAT GTG-3'
5307i3' reverse primer5'-TGC ACC CTT TGC CAG TGG-3'
5307i3'-s2 probe FAM-5'-ACC ACA ATA TAC CCT CTT CCC TGG GCC AG-3'-TAMRA

Праймеры для идентификации ДНК кукурузы (*adhl 1*):
Zm adh1 primer F5'-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'
Zm adh1 primer R5'-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3'
Zm adh1 probe VIC-5'-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-3'- TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК кукурузы 5307

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	Праймер5307i3' forward primer(5 пмоль/мкл)	2,50
3	Праймер5307i3' reverse primer (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд5307i3'-s2 probe (5пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деонизированная	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК кукурузы

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерZmadh1 primer (5 пмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерZmadh1 primer (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд Zmadh1 probe (5пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деонизированная	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °С	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °С	15 с	нет	40
	60 °С	60 с	да (Green, Yellow)	

3.3. Метод количественного определения кукурузы линии ТС 1507.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена *hmgA*, присущего для всех линий кукурузы, и области ДНК, специфичной для трансформационного события ТС 1507 на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ кукурузы ТС 1507 ERM-BF418a (< 0,1 % (m/m); ERM-BF418b (1,0 % (m/m); ERM-BF418c (9,9 % (m/m); ERM-BF418d (98,6 % (m/m).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК кукурузы ТС 1507:

1) MaiY-F15'-TAGTCTTCGGCCAGAATGG-3'
2) MaiY-R35'-CTTTGCCAAGATCAAGCG-3'
3) MaiY-S1FAM- 5'-TAACTCAAGGCCCTCACT CCG-3'-TAMRA

Праймеры для идентификации ДНК кукурузы (*hmgA*):

4) MaiJ-F25'-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'
5) mhmg-rev5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'
6) Mhmg-probeFAM- 5'-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК кукурузы ТС 1507

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMaiY-F1 (5 пмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерMaiY-R3 (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд MaiY-S1 (5 пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деонизированная	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК кукурузы

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMaiJ-F2 (5 пмоль/мкл)	2,50
3	Праймерmhmg-rev (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд Mhmg-probe (5пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мММgCl_2 (10Х)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деонизированная	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °С	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °С	15 с	нет	45
	60 °С	60 с	да (Green)	

IV. Метод приготовления растворов стандартных образцов для построения калибровочной прямой

4.1. Образец приготовления стандартов для построения калибровочной прямой на примере кукурузы MON89034.

4.1.1. Для построения калибровочной прямой необходимо приготовить образцы с 5,0; 1,0 и 0,1 %-м содержанием ГМ кукурузы MON89034. Для этого следует использовать стандартные образцы состава ГМ кукурузы MON89034 (кат. номер AOCS 0906-E), содержание ГМ кукурузы 99,4 %, и ее традиционного аналога (кат. номер AOCS 0906-A).

4.1.2. Приготовление 5 %-го образца: смешать 5,03 г муки ГМ кукурузы и 94,97 г муки ее традиционного аналога. Приготовление 1 %-го образца: смешать 2,0 г 5 %-й смеси ГМ кукурузы MON89034 и 8,0 г муки ее традиционного аналога. Приготовление 0,1 %-го образца: смешать 1,0 г 1,0 %-й ГМ кукурузы MON89034 и 9,0 г муки ее традиционного аналога.

4.1.3. Из полученных смесей выделить ДНК (выделение ДНК – глава IV МУК 4.2.2304—07), полученные растворы ДНК будут содержать ГМ ДНК в количестве 5,0; 1,0 и 0,1 % соответственно.

4.2. Расчет количества рекомбинантной ДНК на основании калибровочной прямой.

4.2.1. Образец расчета количества рекомбинантной ДНК на примере ГМ сои FG72.

Определить пороговый цикл для каждой ПЦР (*Ct*) по кривой амплификации. Рассчитать разность между *Ct*, специфичным для трансформационного события FG72 (линии сои FG72), и *Ct*, специфичным для гена *lec*. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяется по формуле:

$$w = 2^{-(\Delta Ctsam - \Delta Ctref)} \times cref, \text{ где}$$

$\Delta Ctsam$ – разность между значениями *Ct* для трансформационного события FG72 или SYHT0H2 и гена *lec* в исследуемом образце;

$\Delta Ctref$ – разность между значениями *Ct* для трансформационного события FG72 или SYHT0H2 и гена *lec* в стандартном образце;

*c*ref – концентрация стандартного образца.

Предел детекции метода составляет 0,01 %.

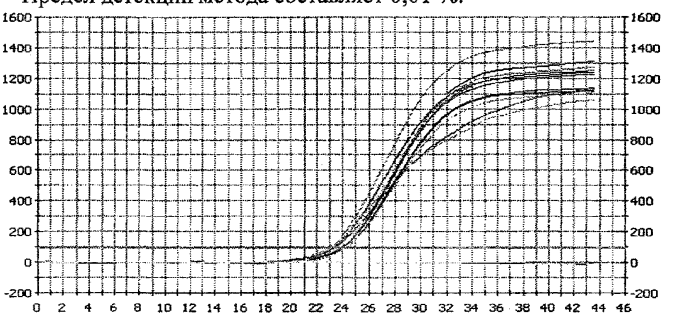

Рис. 1. Кривая зависимости величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для гена *lec*

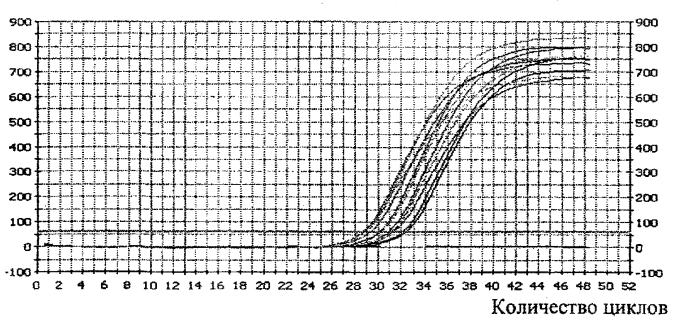

Рис. 2. Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК

4.2.2. Образец расчета количества рекомбинантной ДНК на примере ГМ кукурузы MON89034.

Определить пороговый цикл для каждой ПЦР (*Ct*) по кривой амплификации. Рассчитать разность между *Ct*, специфичным для трансформационного события MON89034 (линии кукурузы MON89034), и *Ct*, специфичным для гена *hmgA*. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяется по формуле, представленной в п. 4.2.1.

Предел детекции метода составляет 0,01 %.

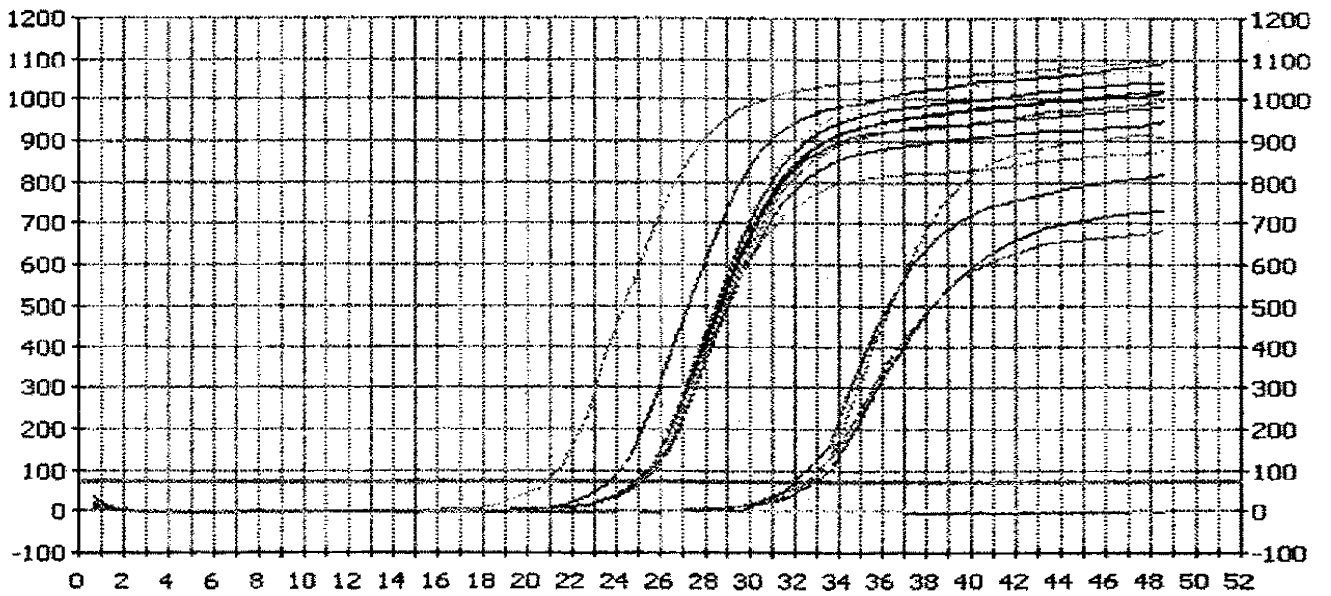

Рис. 3. Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для гена hmgA

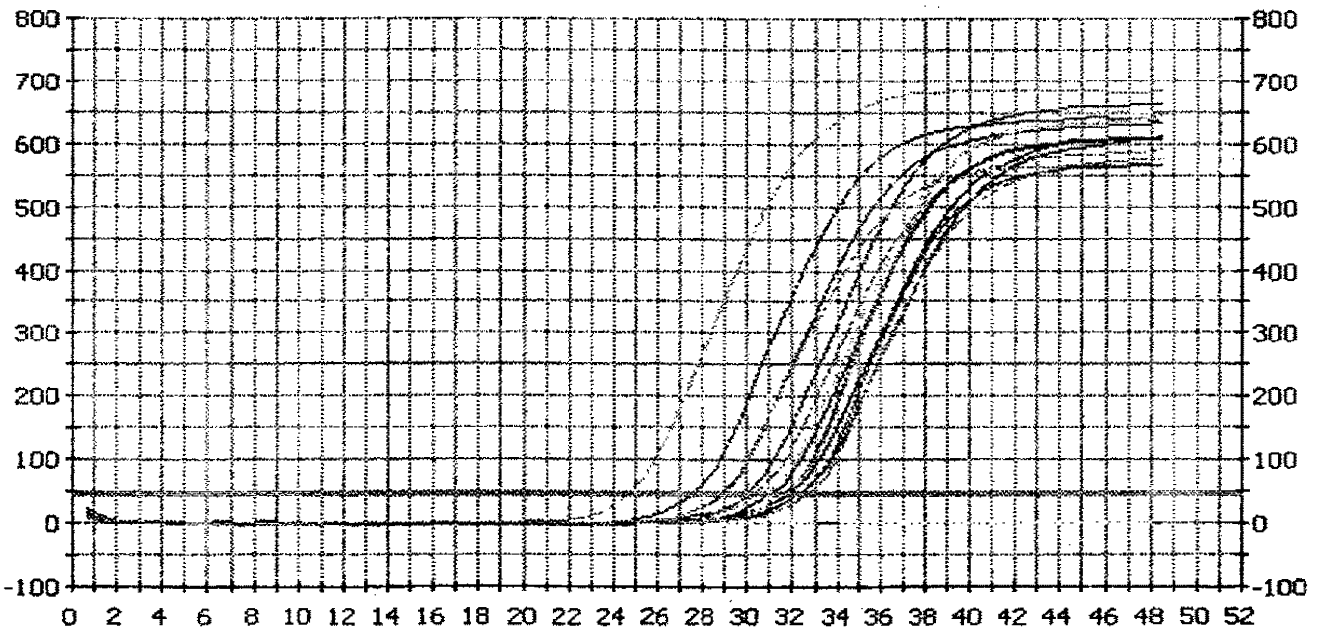

Рис. 4. Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК

V. Правила оформления протокола исследований

Протокол исследований должен содержать следующие пункты.

Название организации, проводившей анализ, адрес, контактный телефон.

Аттестат аккредитации, №__.

Наименование исследуемого образца.

Название организации заявителя.

Нормативная документация, в соответствии с которой проводилась оценка результатов (ТР ТС), ссылка на раздел нормативной документации, в соответствии с которым проводилось измерение.

Сведения об используемых средствах измерения и испытательном оборудовании.

Фактические и нормативные значения измеряемых показателей.

Протокол должен быть заверен печатью организации, проводившей анализ.

Пример.

№ п/п	Наименование определяемого вещества	Фактическое значение, погрешность (ед. измерения)	Нормативное значение показателя (ед. измерения)	Методы определения**	Примечание
1	Рекомбинантная ДНК, специфичная для сои линии 40-3-2	Не обнаружено (предел детекции метода 0,01 %) или Обнаружено (10 %)	Геномная доля, % *	МУК 4.2.2304—07	
* Нормативное значение отсутствует. Порог маркировки/технологически неустранимая примесь: 0,9 %; ** Указывается номер раздела МУК, в соответствии с которым проводилось измерение					

Выводы.

«В исследованном образце продукции **не выявлено** присутствие рекомбинантной ДНК сои линии 40-3-2»,

или

«В исследованном образце продукции **выявлено** присутствие рекомбинантной ДНК сои линии 40-3-2 в количестве 10 % в расчете на общую ДНК сои в образце».

Соя линии 40-3-2 разрешена для использования в пищевой промышленности и для реализации населению на территории Евразийского экономического союза.

Испытания (исследования) провели: должность и Ф.И.О. оператора, подписи.

Также необходимо указать, что результаты испытаний (исследований), представленные в данном Протоколе, относятся только к представленной пробе (образцу).

Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах

Методические указания
МУК 4.2.3309—15

Ответственный за выпуск Н. В. Митрохина

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная вёрстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 24.12.15

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,0
Тираж 150 экз. Заказ 89

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18. стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделением издательского обеспечения
отдела научно-методического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru