ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56058— 2014

КОРМА И КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ

Методы идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 июля 2014 г. № 705-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «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.ru)

© Стандартинформ, 2015

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

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА И КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ

Методы идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения

Feed and feed additives.
Methods of identification and determination GMO of plant origin

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, кормовые добавки и сырье для их производства и устанавливает метод идентификации и количественного определения содержания генетически-модифицированной сои (далее – ГМ сои) и генетически-модифицированной кукурузы (далее – ГМ кукурузы) 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 стандарты:

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

ГОСТ Р ИСО 6497–2011 Корма для животных. Отбор проб

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

ГОСТ Р 51848–2001 Продукция комбикормовая. Термины и определения

ГОСТ Р 52173–2003 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически-модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

ГОСТ Р 53244–2008 (ИСО 21570:2005) Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически-модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот

ГОСТ Р 55576–2013 Корма и кормовые добавки. Метод качественного определения регуляторных последовательностей в геноме сои и кукурузы

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 заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины, определения и сокращения по ГОСТ Р ИСО 6497, ГОСТ Р 51848, ГОСТ Р 55576 и ГОСТ 31719.

4 Условия выполнения испытаний и требования безопасности

Условия выполнения испытаний и требования безопасности – по ГОСТ Р 55576 (раздел 4, приложение А).

Издание официальное

5 Оборудование, материалы и реагенты

5.1 Требования к оборудованию – по ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025.

5.2 При проведении испытаний применяют оборудование и материалы по ГОСТ 31719, а также следующие:

- бокс ламинарный II класса биологической безопасности;
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- микропробирки одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся вместимостью 1,5 $см^3$;
- микропробирки одноразовые полипропиленовые вместимостью 0,2 $см^3$;
- ПЦР-бокс;
- прибор для проведения ПЦР*;
- халаты медицинские.

Допускается использование другого оборудования и материалов с техническими характеристиками не хуже указанных выше.

5.3 При проведения испытаний применяют реагенты для экстракции ДНК по ГОСТ Р 55576, а также следующие реагенты, праймеры и зонды для проведения ПЦР и амплификации.

5.3.1 Реагенты:

- вода деионизованная;
- ПЦР-буфер;
- раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) 10^x (10-кратная смесь четырех компонентов с концентрацией каждого компонента 1,76 × 10^{-3} моль/$дм^3$);
- *Taq*-полимераза термостабильная;
- образцы стандартные состава ГМ сои и ГМ кукурузы, содержащие от 0,1 % до 5,0 % линий ГМ сои и ГМ кукурузы*.

Допускается использование других реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных выше.

5.3.2 Праймеры (смесь олигонуклеотидов) и зонды (меченные флуоресцентными красителями *FAM* и *R6G*):

5.3.2.1 Для определения ГМ сои линии 40-3-2:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`- GCC ATG TTG TTA ATT TGT GCC AT 3`;
2) праймер 2: 5`- GAA GTT CAT TTC ATT TGG AGA GGA C 3`;
3) зонд: 5`- FAM-CTT GAA AGA TCT GCT AGA GTC AGC TTG TCA GCG – BHQ1-3`;

б) специфичные гену лектина (*lec*1):

1) праймер 1: 5`-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T -3`;
2) праймер 2: 5`- GGC ATA GAA GGT GAA GTT GAA GGA-3`;
3) зонд: 5` - R6G-AAC CGG TAG CGT TGC CAG CTT CG -BHQ1 -3`;

5.3.2.2 Для определения ГМ сои линии A2704-12:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`- GCA AAA AAG CGG TTA GCT CCT-3`;
2) праймер 2:5`- ATT CAG GCT GCG CAA CTG TT-3`;
3) зонд: 5`- FAM-CGG TCC TCC GAT CGC CCT TCC-BHQ1-3`;

б) специфичные гену лектина (*lec*2):

1) праймер 1: 5`-CAC CTT TCT CGC ACC AAT TGA CA-3`;
2) праймер 2: 5`-TCA AAC TCA ACA GCG ACG AC-3`;
3) зонд: 5`-R6G-CCA CAA ACA CAT GCA GGT TAT CTT GG -BHQ1 -3`.

5.3.2.3 Для определения ГМ сои линии A5547-127:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`- GCT ATT TGG TGG CAT TTT TCC A 3`;
2) праймер 2: 5`- CAC TGC GGC CAA CTT ACT TCT 3`;
3) зонд: 5`- FAM-CC GCA ATG TCA TAC CGT CAT CGT TGT-BHQ1-3`;

б) специфичные гену лектина (*lec*3):

1) праймер 1: 5`- CCT TCT CGC ACC AAT TGA CA -3`;
2) праймер 2: 5`- TCA AAC TCA ACA GCG ACG AC -3`;

---

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

* Стандартные образцы состава ГМ сои и ГМ кукурузы «Сигма Алдрич»,*CCM* от *JRC*, *IRMM*. Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

3) зонд: 5`-R6G-CC ACA AAC ACA TGC AGG TTA TCT TGG-BHQ1 -3`;

5.3.2.4 Для определения ГМ кукурузы линии *MON* 810:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`-TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT-3`;

2) праймер 2: 5`-GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3`;

3) зонд: 5`-FAM-AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*hmg*):

1) праймер 1: 5`-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3`;

2) праймер 2: 5`-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3`;

3) зонд: 5`-R6G-CAA TCC ACA CAA ACG CAC GCG TA-BHQ1-3`;

5.3.2.5 Для определения ГМ кукурузы линии *NK* 603:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`-ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA-3`;

2) праймер 2: 5`-AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAA CAC T-3`;

3) зонд: 5`-FAM-TGG TAC CAC GCG ACA CAC TTC CAC TC-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*adhl* 1):

1) праймер 1: 5`-CCA GCC TCA TGG CCA AAG-3`;

2) праймер 2: 5`-CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG-3`;

3) зонд: 5`-R6G-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT-BHQ1-3`;

5.3.2.6 Для определения ГМ кукурузы линии *Bt* 11:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`-GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA-3`;

2) праймер 2: 5`-TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG-3`;

3) зонд: 5`-FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TGT ATC CGC TCA-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*adhl* 2):

1) праймер 1: 5`-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3`;

2) праймер 2: 5`-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3`;

3) зонд: 5`-R6G-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-BHQ1-3`;

5.3.2.7 Для определения ГМ кукурузы линии *T* 25:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`- ACA AGC GTG TCG TGC TCC AC-3`;

2) праймер 2: 5`- GAC ATG ATA CTC CTT CCA CCG-3`;

3) зонд: 5`-FAM-TCA TTG AGT CGT TCC GCC ATT GTC G-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*adhl* 3):

1) праймер 1: 5`-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CCT-3`;

2) праймер 2: 5`-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3`;

3) зонд: 5`-R6G-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-BHQ1-3`;

5.3.2.8 Для определения ГМ кукурузы линии *GA* 21:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`-CTT ATC GTT ATG CTA TTT GCA ACT TTA GA-3`;

2) праймер 2: 5`-TGG CTC GCG ATC CTC CT-3`;

3) зонд: 5`-FAM-CAT ATA CTA ACT CAT ATC TCT TTC TCA ACA GCA CCT GGG-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*adhl* 4):

1) праймер 1: 5`-CCA GCC TCA TGG CCA AAG-3`;

2) праймер 2: 5`-CCT TCC TTG GCG GCT TAT CTG-3`;

3) зонд: 5`-R6G-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT-BHQ1-3`;

5.3.2.9 Для определения ГМ кукурузы линии *MIR* 604:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`-GCG CAC GCA ATT CAA CAG-3`;

2) праймер 2: 5`-GGT CAT AAC GTC ACT CCC TTA ATT CT-3`;

3) зонд: 5`-FAM-AGG CGG GAA ACG ACA ATC TGA TCA TG-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*adhl* 5):

1) праймер 1: 5`-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3`;

2) праймер 2: 5`-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3`;

3) зонд: 5`-R6G-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-BHQ1-3`;

5.3.2.10 Для определения ГМ кукурузы линии *MON* 863:

а) специфичные целевой последовательности:

1) праймер 1: 5`-GTA GGA TCG GAA AGC TTG GTA C -3`;

2) праймер 2: 5`-TGT TAC GGC CTA AAT GCT GAA CT-3`;

3) зонд: 5`-FAM-TGA ACA CCC ATC CGA ACA AGT AGG GTC A-BHQ1-3`;

б) специфичные гену зеина (*adhl* 6):

1) праймер 1: 5`-CCA GCC TCA TGG CCA AAG-3`;

2) праймер 2: 5`-CCT TCT TGG CGG CTT ATC TG-3`;

3) зонд: 5`-R6G-CTT AGG GGC AGA CTC CCG TGT TCC CT-BHQ1-3`.

6 Сущность метода

6.1 Сущность метода идентификации и количественного определения содержания ГМ сои и ГМ кукурузы 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 эндогенной ДНК, характерной для всех линий ГМ сои или ГМ кукурузы, и участка рекомбинантной ДНК, специфичной для определенных генетических линий.

6.2 Возможно проведение ПЦР в двух пробирках с использованием одного красителя по ГОСТ Р 53244.

7 Отбор проб

Отбор лабораторных проб, подготовка анализируемой пробы, условия хранения и транспортирования – по ГОСТ Р 55576.

8 Экстракция ДНК

Экстракцию ДНК проводят в соответствии с ГОСТ Р 52173 или ГОСТ Р 55576.

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 ГМ сои или ГМ кукурузы берут 1 мм^3 деионизованной воды, по 1 мм^3 каждого праймера 1 по 5.3.2 концентрацией 5×10^{-6} моль/дм^3, по 1 мм^3 каждого праймера 2 по 5.3.2 концентрацией 5×10^{-6} моль/дм^3, по 1 мм^3 каждого зонда по 5.3.2 концентрацией 3×10^{-6} моль/дм^3, 3 мм^3 раствора дезоксинуклеотидтрифосфатов (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 двух независимых ПЦР в одной пробирке смешивают 10 мм^3 ПЦР-смеси по 9.1, 5 мм^3 ПЦР-буфера и 0,5 мм^3 полимеразы (*TaqF*). Смесь перемешивают и осаждают на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 15–30 с.

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

9.2.4 Ставят контрольные реакции амплификации:

- отрицательный контрольный образец (К-) – вместо ДНК-пробы вносят в микропробирку со смесью по 9.2.2 10 мм^3 ТЕ-буфера;

- положительный контрольный образец (К+) – вместо ДНК-пробы вносят в микропробирку со смесью по 9.2.2 10 мм^3 1 %-ного стандартного образца состава ГМ сои и ГМ кукурузы.

9.2.5 При каждой постановке ПЦР ставят шесть реакций амплификации со стандартными образцами ГМ сои и ГМ кукурузы для построения калибровочной кривой. Для этого в три микропробирки со смесью по 9.2.2 вносят по 10 мм^3 каждого стандартного образца, содержащего от 0,1 % до 5,0 % линий ГМ сои и ГМ кукурузы. Реакцию амплификации проводят в двух повторностях.

Примечание – Стандартный образец может иметь любую концентрацию в пределах указанного диапазона.

9.3 Проведение амплификации и детекции флуоресцентного сигнала

Программируют прибор для проведения ПЦР в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Программа амплификации для количественного определения ГМ сои приведена в таблице 1.

Таблица 1

Стадия амплификации	Программа
Денатурация первичная	95 °С/5 мин
45 циклов	95 °С/15 с
	60 °С/30 с
	72 °С/30 с

Детекцию проводят при температуре 60 °С по каналам *FAM*/*Green*, *JOE*/*Yellow*.

Программа амплификации для количественного определения ГМ кукурузы приведена в таблице 2.

Таблица 2

Стадия амплификации	Программа
Денатурация первичная	95 °С/15 мин
10 циклов	95 °С/15 с 60 °С/20 с 72 °С/15 с
35 циклов	95 °С/15 с 55 °С/20 с 72 °С/15 с

Детекцию проводят при температуре 55 °С по каналам *FAM*/*Green*, *JOE*/*Yellow*.

Детекцию флуоресцентного сигнала проводят на каналах *FAM* и *JOE*. По каналу *FAM* регистрируют уровень флуоресценции для генетической линии, по каналу *JOE* – для эндогенной ДНК ГМ сои или ГМ кукурузы. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализируют с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР в режиме реального времени (*Real Time PCR*).

Границы интервала, в котором погрешность определения находится с доверительной вероятностью P = 0,95, составляют от 0,1 % до 5,0 %, нижнюю и верхнюю границы погрешности определяют с использованием стандартных образцов.

Стандартное отклонение повторяемости результатов δ составляет от 0,067 (для 0,1 %) до 0,54 (для 5 %).

Коэффициент корреляции калибровочной прямой, построенной по стандартным образцам ГМО, (R^2) > 0,97. Если коэффициент корреляции R^2 менее 0,97 – требуется повторный анализ всех проб, начиная с этапа амплификации.

9.4 Учет результатов

Учет результатов и расчет содержания ГМ сои или ГМ кукурузы проводят по ГОСТ Р 53244.

9.5 Возможные ошибки

Возможные ошибки – по ГОСТ Р 55576 (подраздел 10.3).

УДК 636.086.15:636.086.006.034 ОКС 65 120

Ключевые слова: корма, кормовые добавки, генетически модифицированные организмы, генетически модифицированная соя, генетически модифицированная кукуруза, полимеразная цепная реакция, гибридизационно-флуоресцентная детекция в режиме реального времени, амплификация, рекомбинантная ДНК, праймеры, зонды

Подписано в печать 02.02.2015. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 0,93. Тираж 31 экз. Зак. 298.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru