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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
32148—
2013**

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Метод идентификации видовой принадлежности яиц птицы

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом птицеперерабатывающей промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИПП Россельхозакадемии) при участии Общества с ограниченной ответственностью «Компания «БИОКОМ» (ООО «Компания «БИОКОМ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П)

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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2013 г. № 1525-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32148—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

5 Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 54056—2010

6 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

© Стандартинформ, 2014

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ЯИЦ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ

Метод идентификации видовой принадлежности яиц птицы

Foodstuffs of processed poultry eggs. Method for identification of poultry egg species

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые яичные продукты, выработанные из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы: жидкие и сухие яичный меланж, яичный желток, яичные полуфабрикаты и кулинарные изделия — и предназначен для качественной идентификации наличия в яичных продуктах яичного желтка и/или яичного меланжа из яиц кур (Gallus gallus), уток (Anas platyrhynchos), гусей (Anser anser), индейки (Meleagris gallopavo), цесарки (Numida meleagris), перепелов (Coturnix coturnix) и страусов (Struthio camelus) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Настоящий стандарт не распространяется на яичные продукты, содержащие только яичный белок.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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—2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.004—74 Респираторы фильтрующие противогазовые РПГ-67. Технические условия

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 3164—78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 5962—67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 21240—89 Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 21241—89 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 30363—2013 Продукты ячные жидкие и сухие пищевые. Технические условия

ГОСТ 31655—2012 Яйца пищевые (индюшиные, цесариные, перепелиные, страусиные). Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 1719—2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

ГОСТ 31720—2012 Пищевые продукты переработки яиц сельскохозяйственной птицы. Методы отбора проб и органолептического анализа

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 термины по ГОСТ 30363, ГОСТ 31719, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **пищевые яйца (сельскохозяйственной птицы):** Яйца в скорлупе, произведенные сельскохозяйственной птицей, пригодные для непосредственного потребления человеком и переработки с целью получения продуктов питания.

Примечание — Пищевые яйца в зависимости от вида птицы могут подразделяться, например, на куриное, перепелиное, индюшиное.

3.2 **пищевой продукт переработки яиц (сельскохозяйственной птицы):** Пищевой продукт, полученный в промышленных условиях в результате проведения комплекса технологических процессов и/или операций, изменяющих начальные свойства пищевого яйца сельскохозяйственной птицы.

3.3 **яичный меланж:** Пищевой продукт переработки яиц сельскохозяйственной птицы, полученный из яичной массы, прошедшей фильтрацию, гомогенизацию и пастеризацию.

3.4 **купажированный яичный меланж:** Яичный меланж заданного состава, полученный из яичной массы с добавлением яичного белка или яичного желтка.

3.5 **яичный желток [белок]:** Пищевой продукт переработки яиц сельскохозяйственной птицы, полученный из желточной [белковой] массы, прошедшей фильтрацию, гомогенизацию и пастеризацию.

3.6 **жидкий яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], выработанный без добавления или удаления воды.

3.7 **концентрированный яичный меланж [белок]:** Жидкий яичный меланж [белок], из которого частично удалена вода до достижения в нем установленной для данного продукта значения массовой доли сухих веществ, занимающей промежуточное положение между значениями данного показателя жидкого и сухого продуктов.

3.8 **охлажденный яичный меланж [белок, желток]:** Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], подвергнутый охлаждению, с температурой в толще продукта от 0 °С до 4 °С.

3.9 **замороженный яичный меланж [белок, желток]** (Нрк. *мороженый яичный продукт*): Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], подвергнутый замораживанию, с температурой в толще продукта не выше минус 12 °С.

3.10 **глубокозамороженный яичный меланж [белок, желток]:** Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], подвергнутый замораживанию, с температурой в толще продукта не выше минус 18 °С.

3.11 **сухой яичный меланж [белок, желток]** (Нрк. *сухой порошок*): Жидкий яичный меланж [белок, желток] или концентрированный яичный меланж [белок], из которого удалена вода до достижения в нем значения массовой доли сухих веществ 95 % и более.

3.12 **ферментированный яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], полученный в результате воздействия ферментов с целью изменения его функциональных свойств.

3.13 **обессахаренный яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], полученный в результате применения технологических операций по удалению содержащихся в нем сахаров.

3.14 **подкисленный яичный меланж [белок, желток]:** Яичный меланж [белок, желток], полученный в результате применения технологических операций по введению в его состав регуляторов кислотности.

3.15 **полуфабрикат из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях непосредственно из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы в скорлупе или без нее, подготовленный к дальнейшей кулинарной обработке.

Примечания

1 Полуфабрикат из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть изготовлен с добавлением определенных рецептурой ингредиентов, например животного и/или растительного происхождения.

2 В зависимости от термической обработки полуфабрикат из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

3.16 **полуфабрикат из яичного меланжа [белка, желтка]:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях из яичного меланжа [белка, желтка], подготовленный к дальнейшей кулинарной обработке.

Примечания

1 Полуфабрикат из яичного меланжа [белка, желтка] может быть изготовлен с добавлением определенных рецептурой ингредиентов, например животного и/или растительного происхождения.

2 В зависимости от термической обработки полуфабрикат из яичного меланжа [белка, желтка] может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

3.17 **кулинарное изделие из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях непосредственно из яиц сельскохозяйственной птицы в скорлупе или без нее, подвергнутый кулинарной обработке и готовый к употреблению.

Примечания

1 В зависимости от кулинарной обработки кулинарное изделие из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть, например, вареным, жареным.

2 В зависимости от термической обработки кулинарное изделие из пищевых яиц сельскохозяйственной птицы может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

3.18 **кулинарное изделие из яичного меланжа [белка, желтка]:** Пищевой продукт, изготовленный в промышленных условиях из яичного меланжа [белка, желтка], подвергнутый кулинарной обработке и готовый к употреблению.

Примечания

1 В зависимости от кулинарной обработки кулинарное изделие из яичного меланжа [белка, желтка] может быть, например, вареным, жареным.

2 В зависимости от термической обработки кулинарное изделие из яичного меланжа [белка, желтка] может быть охлажденным, замороженным, глубокозамороженным.

4 Сущность метода

Метод качественной идентификации наличия в яичных продуктах яичного желтка и/или яичного меланжа из яиц кур (Gallus gallus), уток (Anas platyrhynchos), гусей (Anser anser), индейки (Meleagris gallopavo), цесарки (Numida meleagris), перепелов (Coturnix coturnix) и страусов (Struthio camelus) основан на выявлении при помощи ПЦР фрагментов видоспецифичной ДНК, присутствие которых в яичном продукте однозначно свидетельствует о наличии в нем компонентов яиц определенного вида птиц. Методика выделения ДНК из пробы основана на сорбции преимущественно высокомолекулярной фракции нуклеиновых кислот на частицах сорбента (частицы окиси кремния размером от 20 до 50 мкм).

5 Средства измерений, оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности взвешивания не более ± 0,001 г.

Приборы, оборудование, химическая посуда и материалы по ГОСТ 31719.

Лабораторный гомогенизатор.

Перчатки резиновые или латексные без пудры по [1] .

Пинцеты медицинские по ГОСТ 21241.

Пробирки пластиковые вместимостью 15 $см^3$ с крышкой.

Скальпели медицинские по ГОСТ 21240.

Ступки фарфоровые с пестиками по ГОСТ 9147.

Шпатели одноразовые.

Спирт этиловый 95 %-ный, ректификованный по ГОСТ 5962.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Дезинфицирующие растворы, вызывающие деградацию ДНК.

Набор реагентов для выделения ДНК сорбционным методом по ГОСТ 31719.

Наборы реагентов для амплификации методом ПЦР с детекцией продуктов амплификации с помощью электрофореза, включающие:

- пробирки амплификационные с лиофильно высушенной амплификационной смесью по ГОСТ 31719;
- ПЦР-растворитель по ГОСТ 31719;
- смесь праймеров (олигонуклеотидов) для амплификации целевых нуклеотидных последовательностей видоспецифичных фрагментов генома птиц:

а) курица:
1) прямой: 5'-TCACATCGGACGAGGCCTA-3';
2) обратный: 5'-GGAATGGGGTGAGTATGAGAGTT-3';

б) утка:
1) прямой: 5'-TGCTCACTCTTATAGCAACTGCC-3';
2) обратный: 5'-AGGCTCATTCTACCAGGGTCTGT-3';

в) гусь:
1) прямой: 5'-CTCGCCTTCTCCTCAGTAGCTC-3';
2) обратный: 5'-GGCAGTTGCTATTAGGGTGAGTAGG-3';

г) индейка:
1) прямой: 5'-AACCTGAAATACAGGAGTAG-3';
2) обратный: 5'-TAGGGTTAATGTGAGTAAG-3';

д) цесарка:
1) прямой: 5'-ACACTAATAGCAACCGCTTTC-3';
2) обратный: 5'-AGTTTGTTTGGAATTGAGCGG-3';

е) перепел:
1) прямой: 5'-ATGTCCAATACGGATGACTA-3';
2) обратный: 5'-AATAGGGCTAGGGTTAGGAG-3';

ж) страус:
1) прямой: 5'-CCCTACATCGGACAAACCCT-3';
2) обратный: 5'-GGTGATGCCAGCGATTACAA-3'.

Контрольный образец (К+), содержащий видоспецифичную ДНК (геномную ДНК или синтетический целевой фрагмент ДНК) птиц.

Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.

Набор реагентов для детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле по ГОСТ 31719.

Наборы реагентов для ПЦР в режиме реального времени, включающие:

- пробирки амплификационные с лиофильно высушенной амплификационной смесью состава по ГОСТ 31719 для проведения ПЦР в режиме реального времени;
- ПЦР-растворитель, содержащий интеркалирующий краситель SYBR Green по ГОСТ 31719;
- смесь праймеров (олигонуклеотидов) для амплификации целевых нуклеотидных последовательностей видоспецифичных фрагментов генома птиц:

а) курица:
1) прямой: 5'-TCACATCGGACGAGGCCTA-3';
2) обратный: 5'-GGAATGGGGTGAGTATGAGAGTT-3';

б) утка:
1) прямой: 5'-TGCTCACTCTTATAGCAACTGCC-3';
2) обратный: 5'-AGGCTCATTCTACCAGGGTCTGT-3';

в) гусь:
1) прямой: 5'-CTCGCCTTCTCCTCAGTAGCTC-3';
2) обратный: 5'-GGCAGTTGCTATTAGGGTGAGTAGG-3';

г) индейка:
1) прямой: 5'-AACCTGAAATACAGGAGTAG-3';
2) обратный: 5'-TAGGGTTAATGTGAGTAAG-3';

д) цесарка:
1) прямой: 5'-ACACTAATAGCAACCGCTTTC-3';
2) обратный: 5'-AGTTTGTTTGGAATTGAGCGG-3';

е) перепел:
1) прямой: 5'-ATGTCCAATACGGATGACTA-3';
2) обратный: 5'-AATAGGGCTAGGGTTAGGAG-3';
ж) страус:
1) прямой: 5'-CCCTACATCGGACAAACCCT-3';
2) обратный: 5'-GGTGATGCCAGCGATTACAA-3'.

Контрольный образец (К+), содержащий видоспецифичную ДНК (геномную ДНК или синтетический целевой фрагмент ДНК) птиц.

Допускается применение приборов и оборудования с техническими и средств измерений с метрологическими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Приготовление реагентов для выделения ДНК

Реагенты для выделения и очистки ДНК готовят по ГОСТ 31719.

6.2 Приготовление реагентов и агарозного геля для электрофореза

Приготовление реагентов и агарозного геля для электрофореза проводят по ГОСТ 31719.

6.3 Приготовление пробы

6.3.1 Отбор проб яиц проводят по ГОСТ 31655 и [2]. Отбор и подготовку лабораторных проб яичных продуктов проводят по ГОСТ 31720. При отборе проб, их транспортировании и хранении должны быть приняты меры, исключающие перекрестную контаминацию (загрязнение одного образца другим). Для этого отбор проб проводят в перчатках, а инструменты, применяемые для отбора и измельчения материала, используют однократно или обрабатывают моющими средствами и стерилизуют в пламени спиртовки или газовой горелки при переходе от пробы к пробе. Отбор проб проводят в чистую стеклянную или пластиковую посуду или одноразовые пластиковые пакеты.

Подготовку проб для анализа проводят в условиях ПЦР-лаборатории в зоне первичной обработки материала с соблюдением условий, указанных в ГОСТ 31719.

6.3.2 Подготовка проб яиц

Яйца в скорлупе разбивают и осторожно, не повреждая желток, отделяют основную массу яичного белка. Оставшиеся желтки тщательно перемешивают или гомогенизируют до однородной массы, не допуская вспенивания. Далее поступают по 6.3.3.

6.3.3 Подготовка проб жидких яичных продуктов

Содержимое тары с лабораторной пробой или каждой из доставленной потребительской тары с продуктом тщательно перемешивают при помощи одноразового шпателя. Затем отбирают из разных мест лабораторной пробы или из разных единиц потребительской тары по 1 $см^3$ продукта, переносят в одноразовую пластиковую пробирку вместимостью 15 $см^3$ и тщательно перемешивают, формируя объединенную пробу. Отбирают 1 $см^3$ объединенной пробы, помещают в одноразовую микропробирку вместимостью 1,5 $см^3$, маркируют и хранят до и после проведения анализа.

6.3.4 Подготовка проб сухих яичных продуктов

От доставленной лабораторной пробы отбирают не менее 10 порций по 5—10 г каждая, помещая их в одноразовый полиэтиленовый пакет размером 20 × 30 см, и перемешивают при помощи одноразового шпателя, формируя объединенную пробу 50—100 г. От полученной объединенной пробы отбирают порцию массой примерно 10 г, помещают в одноразовую, герметично закрывающуюся пробирку или контейнер, маркируют и хранят до проведения анализа. Если объединенная проба не является гомогенной, то отобранную от нее порцию предварительно растирают в фарфоровой ступке до однородного мелкодисперсного состояния.

6.3.5 Подготовка проб яичных полуфабрикатов и кулинарных изделий

От поступившего на исследование лабораторного образца (или продукта в потребительской таре) отбирают не менее 10 порций по 5—10 г каждая и измельчают в фарфоровой ступке. Измельченный материал 50—100 г помещают в одноразовый полиэтиленовый пакет размером 20 × 30 см, перемешивают при помощи одноразового шпателя. От объединенной пробы отбирают порцию массой примерно 10 г, помещают ее в одноразовую, герметично закрывающуюся пробирку или контейнер, маркируют и хранят до и после проведения анализа. Перед началом исследования маркированную пробу измельчают при помощи скальпеля (ножниц), помещают в фарфоровую ступку и растирают до однородного мелкодисперсного состояния.

6.4 Выделение и очистка ДНК

6.4.1 От приготовленных по 6.3.2—6.6.5 проб отбирают с помощью автоматического дозатора 100—150 мм^3 жидкого яичного меланжа или 50—100 мм^3 жидкого яичного желтка или с помощью одноразового шпателя отбирают 75—100 мм^3 (по насыпному объему) сухого яичного продукта или 100—150 мм^3 (по насыпному объему) яичного полуфабриката или кулинарного изделия, и помещают в одноразовую микропробирку вместимостью 1,5 см^3, которую затем маркируют. Для каждой пробы готовят три параллельные пробирки с яичным продуктом.

Минимальная масса отобранной для выделения ДНК пробы: сухие яичные продукты — 15 мг, жидкие яичные продукты, яичные полуфабрикаты или кулинарные изделия — 50 мг. При необходимости отбираемый объем пробы предварительно оценивают с помощью взвешивания с записью результата в миллиграммах.

6.4.2 Лизис клеток, сорбцию и очистку ДНК проводят по ГОСТ 31719 в пробирках с подготовленной по 6.3.5 пробой.

6.4.3 Приготовленный по 6.4.2 очищенный экстракт ДНК переносят в чистую микропробирку, не задевая при этом осадка, поскольку попадание в нее сорбента может в дальнейшем приводить к ингибированию ПЦР. Полученный экстракт ДНК используют для проведения амплификации и при необходимости хранят при температуре 4 °С не более 1 мес или при температуре минус 18 °С не более одного года.

6.4.4 В чистую микропробирку отбирают 0,03—0,08 см^3 ТЕ-буфера (элюирующего раствора) по ГОСТ 31719 и используют при проведении амплификации в качестве контрольной отрицательной пробы (проба К-).

7 Проведение анализа

Для выявления фрагментов видоспецифичной ДНК растений и животных используют наборы реагентов для амплификации методом ПЦР, содержащие праймеры 4, специфичные к ДНК определенного вида птиц.

7.1 Амплификация фрагментов видоспецифичной ДНК птиц с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза

7.1.1 В штативе размещают и маркируют необходимое число микропробирок с лиофильно высушенной амплификационной ПЦР-смесью по ГОСТ 31719 (три пробирки для каждой пробы), включая пробирки для положительного и отрицательного контролей.

7.1.2 В каждую микропробирку с ПЦР-смесью при помощи автоматического дозатора по ГОСТ 31719 последовательно вносят 10 мм^3 ПЦР-растворителя по ГОСТ 31719 и 5 мм^3 смеси праймеров 4 для выявления фрагмента видоспецифичной ДНК птиц. Перед использованием смесь праймеров необходимо разморозить в твердотельном термостате по ГОСТ 31719 при температуре 4 °С, перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 5—10 с, а затем собрать осаждением на дно микропробирки путем центрифугирования на микроцентрифуге-встряхивателе по ГОСТ 31719 при 2000 об/мин в течение 3—5 с. Последующую работу с праймерами рекомендуется проводить при температуре от 2 °С до 4 °С с использованием твердотельного термостата с охлаждением по ГОСТ 31719

7.1.3 В микропробирку с ПЦР-смесью для отрицательного контрольного образца вносят 5 мм^3 ТЕ-буфера (отрицательная контрольная проба К-), подготовленного по 6.1. Затем в микропробирки с ПЦР-смесью добавляют по 5 мм^3 экстракта ДНК (6.4.2) (три пробирки для каждого из исследуемых образцов). В последнюю очередь в микропробирку с ПЦР-смесью для положительного контрольного образца вносят 0,005 см^3 положительной контрольной пробы (К+).

7.1.4 Содержимое микропробирок растворяют путем легкого перемешивания на микроцентрифуге-встряхивателе. После этого собирают осаждением капли ПЦР-смеси со стенок микропробирок путем центрифугирования на микроцентрифуге-встряхивателе по ГОСТ 31719 при 2000 об/мин в течение 3—5 с.

7.1.5 Если для проведения амплификации используется амплификатор без нагреваемой крышки, то в каждую микропробирку добавляют по 0,020—0,025 см^3 (две капли) вазелинового масла.

7.1.6 Плотно закрытые микропробирки центрифугируют в течение 5—7 с на микроцентрифуге-встряхивателе при 2000 об/мин и помещают в амплификатор по ГОСТ 31719 для проведения амплификации по программе, указанной в таблице 1. По окончании действия программы пробирки извлекают из амплификатора и в штативе передают на этап детекции продуктов ПЦР методом электрофореза.

Таблица 1 — Программа амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК птиц (ПЦР с детекцией методом электрофореза)

Этап программы	Режим амплификации		Процесс	Число циклов
	Температура, °С	Время, с		
1	94	180	Денатурация ДНК	1
2	94	30	Денатурация ДНК	40
	65	40	Отжиг праймеров	
	72	20	Синтез ДНК	
3	72	180	Синтез ДНК	1
Примечание — Использование амплификаторов различных моделей может потребовать изменения времени каждого шага и/или изменения температуры отжига праймеров на 1 °С—2 °С.				

7.2 Амплификация фрагментов видоспецифичной ДНК птиц с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (RT-ПЦР)

7.2.1 В штативе размещают и маркируют необходимое количество микропробирок с лиофильно высушенной амплификационной ПЦР-смесью по ГОСТ 31719 (для RT-ПЦР) — не менее трех пробирок для одной пробы, а также микропробирки для отрицательной (К-) и положительной (К+) проб. В случае исследования многокомпонентных продуктов число микропробирок на одну пробу рассчитывают, исходя из того, какое число видов птицы планируется идентифицировать.

7.2.2 В каждую микропробирку с ПЦР-смесью (для RT-ПЦР) при помощи автоматического дозатора вносят 10 мм^3 ПЦР-растворителя по ГОСТ 31719, содержащего интеркалирующий растворитель SYBR Green и 10 мм^3 смеси праймеров 4 для выявления фрагмента ДНК определенного вида птицы. Перед использованием смесь праймеров готовят по 7.1.2.

7.2.3 В микропробирку с ПЦР-смесью для К- вносят 10 мм^3 ТЕ-буфера (элюирующего раствора), подготовленного по 6.1 Затем в микропробирки с ПЦР-смесью (для RT-ПЦР) добавляют по 5 мм^3 экстракта ДНК (6.4.2) каждого из исследуемых образцов. В последнюю очередь в микропробирку с ПЦР-смесью для положительного контрольного образца вносят 0,005 см^3 положительного контроля К+. Содержимое пробирок растворяют путем легкого перемешивания на микроцентрифуге-встряхивателе по ГОСТ 31719. После этого собирают осаждением капли ПЦР-смеси со стенок пробирок путем центрифугирования на микроцентрифуге-встряхивателе при 2000 об/мин в течение 3—5 с.

7.2.4 Если конструкция используемой модели амплификатора (ГОСТ 31719) требует проведения ПЦР в специальных пробирках-контейнерах, то полученное после растворения и перемешивания содержимое пробирок для амплификации полностью переносят в такие контейнеры.

7.2.5 Плотно закрытые микропробирки центрифугируют 5—7 с на микроцентрифуге-встряхивателе при 2000 об/мин и помещают в амплификатор для проведения амплификации по программе, указанной в таблице 2.

Таблица 2 —Программа амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК разных видов птицы (RT-ПЦР с детекцией в режиме реального времени)

Этап программы	Режим амплификации		Процесс	Число циклов
	Температура, °С	Время, с		
1	94	180	Денатурация ДНК	1
2	94	20	Денатурация ДНК	40
	65	20	Отжиг праймеров	
	70	20	Синтез ДНК	
Примечание — Использование амплификаторов с нагревающейся крышкой может потребовать уменьшения температуры отжига праймеров и элонгации на 1 °С — 2 °С. На шаге «Синтез ДНК» включается оптика для измерения флуоресценции красителя (в реальном времени), рабочим каналом является № 1 (для красителя FAM или SYBR Green длины волны возбуждения/измерения равны 494/519 нм), номер канала у разных приборов может отличаться (см. инструкцию к прибору).				

7.2.6 Проводят регистрацию результатов ПЦР в соответствии с инструкцией к используемой модели амплификатора по ГОСТ 31719 для проведения RT-ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

8 Детекция (обнаружение) продуктов амплификации

8.1 Детекцию продуктов амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК методом электрофореза проводят по ГОСТ 31719*.

Регистрацию и документирование полученных результатов путем занесения в базу данных компьютера осуществляют при помощи системы для документирования гелей по ГОСТ 31719 в соответствии с прилагаемым к ней техническим описанием.

8.2 Детекцию продуктов амплификации фрагментов видоспецифичной ДНК птиц в режиме реального времени проводят по ГОСТ 31719**.

Результаты качественного анализа отображаются с помощью программного обеспечения прибора в виде кривых флюоресценции и в виде табличных данных, содержащих количество циклов *log*-фазы (ГОСТ 31719), полученных для анализируемых проб, а также отрицательной (К-) и положительной (К+) проб.

9 Обработка результатов анализа

9.1 ПЦР с детекцией продуктов амплификации методом электрофореза

Оценку результатов анализа проводят визуально сравнением взаимного расположения на электрофореграммах анализируемой пробы и контрольных проб полос, соответствующих видоспецифичному фрагменту ДНК птиц, полученному в реакции с положительным контролем К+.

Положительными, то есть содержащими видоспецифичный фрагмент ДНК, считаются пробы, содержащие светящиеся полосы на электрофореграммах не менее чем двух из трех параллельных проб и расположенные на таком же расстоянии от старта, что и полоса, соответствующая положительной контрольной пробе К+. При этом на электрофореграмме отрицательной контрольной пробы К- соответствующая полоса должна отсутствовать.

Если светящаяся полоса видоспецифического фрагмента ДНК присутствует только на электрофореграмме одной параллельной пробы, а на двух других отсутствует, а также в случае отсутствия полосы фрагмента ДНК на электрофореграмме пробы К+ и/или присутствия полосы на фореграмме пробы К-, то результат считается сомнительным. В этом случае необходимо провести повторную амплификацию с анализируемым экстрактом ДНК. Если удовлетворительный результат не будет достигнут и в этом случае, то необходимо провести повторный анализ, начиная с выделения ДНК из новой пробы исследуемого яичного продукта.

9.2 RT-ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени

Оценку результатов анализа проводят визуально сравнением кривых флюоресценции для анализируемых проб и контрольных проб К- и К+, а также по значениям циклов *log*-фазы.

Положительными, то есть содержащими видоспецифичный фрагмент ДНК, считаются пробы, для которых в процессе амплификации наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции (кривая флуоресценции имеет S-образную форму) и количество циклов *log*-фазы имеет конечное значение (не более 40). При этом должны выполняться следующие условия: для всех положительных проб К+ должно наблюдаться увеличение интенсивности флуоресценции и кривая флуоресценции должна иметь S-образную форму; в контрольных отрицательных пробах К- не должно происходить накопление продуктов ПЦР, поэтому график флуоресценции для всех этих проб должен иметь вид прямой линии. При нарушении хотя бы одного из этих условий необходимо провести повторную амплификацию с анализируемым экстрактом ДНК. Если удовлетворительный результат не будет достигнут и в этом случае, то необходимо провести повторный анализ, начиная с выделения ДНК из новой пробы исследуемого яичного продукта.

9.3 Оформление результатов анализа

При положительной детекции продуктов амплификации в протоколе испытаний указывают: «Видоспецифичный фрагмент ДНК [вид птицы] — обнаружен».

---

* Детекцию данным методом проводят в случае анализа по 7.1.

** Детекцию данным методом проводят в случае анализа по 7.2.

10 Требования к условиям проведения анализа

Устройство лаборатории для проведения анализа методом ПЦР, условия и процедура анализа должны удовлетворять требованиям ГОСТ 31719 и [2].

11 Требования к квалификации оператора

К проведению анализа допускаются специалисты, удовлетворяющие требованиям ГОСТ 31719 и [2].

12 Требования безопасности

12.1 При выполнении всех работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

12.2 Помещение 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.

12.3 При работе с электроустановками требования к безопасности должны соответствовать ГОСТ 12.1.019.

12.4 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.4.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

Библиография

[1] ISO 11193-1:2008 Single-use Medical examination gloves — Part 1: Specification for gloves made from rubber latex or rubber solution (Перчатки медицинские одноразового применения. Часть 1. Требования к перчаткам из каучукового латекса или смесей на основе каучука)

[2] ISO 24276:2006 Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions (Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения)

УДК 637.544:006.354 МКС 67.120.20

Ключевые слова: сухие и жидкие яичные продукты, яичные полуфабрикаты, яичные кулинарные изделия, идентификация наличия яиц, метод полимеразной цепной реакции, фрагмент ДНК птиц

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *О.Н. Власова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 19.03.2014. Подписано в печать 02.04.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,19. Тираж 98 экз. Зак. 605.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru