4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

Методические указания
МУК 4.2.1903—04

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: Институтом физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН и Институтом молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

2. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г. Г. Онищенко 06.03.04.

3. Введены впервые.

Содержание

1. Область применения ... 32
2. Нормативные ссылки ... 32
3. Определения ... 33
4. Аппаратура, материалы и реактивы ... 34
5. Отбор проб ... 37
6. Подготовка к проведению анализа ... 37
6.1. Приготовление растворов ... 37
6.2. Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК) ... 38
7. Проведение анализа ... 40
7.1. Проведение асимметричной мультиплексной ПЦР ... 40
7.2. Гибридизация на биологическом микрочипе ... 40
8. Обработка результатов анализа ... 41
9. Требования безопасности ... 42
Приложение А ... 43
Приложение Б ... 43
Приложение В ... 44
Приложение Г ... 45
Библиография ... 45

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
6 марта 2004 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

Методические указания
МУК 4.2.1903—04

1. Область применения

Настоящие методические указания распространяются на пищевое сырье (в т. ч. посевной и посадочный материал), пищевые продукты, цветы (далее – *продукт*) и устанавливает метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с использованием биологического микрочипа.

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

Методические указания предназначены для применения в лабораториях учреждений санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, осуществляющей контроль за качеством продовольственного сырья и пищевых продуктов, в т. ч. импортируемых в Российскую Федерацию, гигиеническую оценку и выдачу санитарно-эпидемиологических заключений в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке на право проведения контроля безопасности пищевой продукции и продовольственного сырья.

2. Нормативные ссылки

В настоящих методических указаниях использованы ссылки на следующие стандарты.

ГОСТ 12.1.004—91. Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.007—76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

ГОСТ 12.1.019—79. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ 12.4.009—83. Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание.

ГОСТ 12.4.021—75. Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования.

ГОСТ 1770—74. Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 3118—77. Кислота соляная. Технические условия.

ГОСТ 3164—78. Масло вазелиновое медицинское. Технические условия.

ГОСТ 4233—77. Натрий хлористый. Технические условия.

ГОСТ 4328—77. Натрия гидроокись. Технические условия.

ГОСТ 6709—72. Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 9284—75. Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия.

ГОСТ 9805—84. Спирт изопропиловый. Технические условия.

ГОСТ 12026—76. Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.

ГОСТ 12738—77. Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия.

ГОСТ 13646—68. Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия.

ГОСТ 21400—75. Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 24104—01. Весы лабораторные. Общие технические требования.

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

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1-81). Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Ч. 1. Общие требования.

ГОСТ Р 51652—00. Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия.

3. Определения

В настоящих методических указаниях применяют следующие термины с соответствующими определениями.

3.1. *Биологическая безопасность* – в соответствии с прилож. А.

3.2. *Генетически модифицированные источники* – сырье и пищевые продукты (компоненты), используемые человеком в натуральном или переработанном виде, полученные из генетически модифицированных организмов или содержащие их в своем составе.

3.3. *Генетически модифицированный организм* – организм, генетический материал которого изменен с применением методов генной инженерии.

3.4. *Генная инженерия* – совокупность приемов, методов и технологий, в т. ч. технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

3.5. *Биологический микрочип* – микроматрица с ячейками, в которых иммобилизован набор олигонуклеотидов.

3.6. *Праймер* – последовательность однотяжевой ДНК длиной до 25 нуклеотидов, применяемая для проведения асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции.

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

4. Аппаратура, материалы и реактивы

4.1. Компьютерная программа «Imageware» для анализа изображений, полученных с помощью «Чипдетектора-03» [1].

4.2. Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов типа «Чипдетектор-03» [2].

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

4.4. Термостат суховоздушный типа ТВЗ-25 с рабочей температурой 37 °С, рабочий диапазон от 20 до 60 °С, точность поддержания температуры ± 1 °С [4].

4.5. Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности (условное обозначение II) с пределом допустимой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,0001 г.

4.6. Камера морозильная по ГОСТ 26678, обеспечивающая температуру минус 20 °С.

4.7. Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

4.8. Микроцентрифуга настольная типа 5415С с частотой вращения не менее 13 000 $мин^{-1}$ [5].

4.9. Мешалка магнитная с подогревом [6].

4.10. Аппарат для встряхивания типа CV-1500 с частотой вращения не менее 1 500 $мин^{-1}$ [7].

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

4.12. Микродозаторы с переменным объемом дозирования: 0,5—10,0 $мм^3$ (шаг – 0,1 $мм^3$, точность ± 2,5—10,0 %, воспроизводимость 3—7 %); 5,0—50,0 $мм^3$ (шаг – 0,5 $мм^3$, точность ± 2,0—5,0 %, воспроизводимость 2,5—5 %); 20,0—200,0 $мм^3$ (шаг – 1,0 $мм^3$, точность ± 1,5—2,0 %, воспроизводимость 2—3 %); 100—1 000 $мм^3$ (шаг – 5 $мм^3$, точность ± 1,0—1,5 %, воспроизводимость 1—2 %).

4.13. Штативы под микроцентрифужные пробирки типа RP-30 и RP-80 на 30 и 80 шт. [8].

4.14. Наконечники с фильтром для микродозаторов (микропипеток) с переменным объемом дозирования жидкостей до 10; 20; 200; 1 000 $мм^3$ [9].

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

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

4.17. Цилиндры стеклянные мерные лабораторные по ГОСТ 1770 на 25, 100, 250 и 1 000 $см^3$.

4.18. Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические по ГОСТ 25336 вместимостью 50—1 000 $см^3$.

4.19. Пипетки стеклянные градуированные по ГОСТ 29227.

4.20. Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.21. Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.

4.22. Кислота соляная концентрированная по ГОСТ 3118, хч.

4.23. Натрий хлористый по ГОСТ 4233, хч.

4.24. Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль дигидрат (ЭДТА) [10].

4.25. Трис(оксиметил)аминометан [11].

4.26. Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652, хч.

4.27. Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, хч.

4.28. Додецилсульфат натрия (SDS) [12].

4.29. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

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

4.31. Фермент термостабильный Taq-полимераза, оптимум активности при 70—72 °С [13].

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

4.33. Гуанидин тиоцианат [14].

4.34. N-[2-оксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [15].

4.35. Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.

4.36. Раствор водный дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ с концентрацией 2 мМ каждого [16].

4.37. Раствор заведомо трансгенной ДНК (около 100 нг/$мм^3$ или 10^6 копий/$мм^3$) [17].

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

4.39. Баня водяная [19].

4.40. Раствор водный праймеров «ПР-1» для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров.

Праймеры на промотор 35S вируса мозаики цветной капусты:

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

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

Праймеры на маркерный ген *gus* из бактерии *Escherichia* coli:

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

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

Праймеры на промотор *nos* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens:*

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

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

Праймеры на маркерный ген *npt* II из транспазона Tn5 бактериального происхождения:

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

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

Праймеры на терминатор *ocs* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens:*

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

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

Примечание. В обозначениях праймеров индекс «_п» означает «прямой», индекс «_оф» означает «обратный флуоресцентно-меченый»; н. о. – нуклеотидные остатки [20].

4.41. Биологический микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами, приведенными в табл. 1 [21].

Таблица 1

Олигонуклеотиды, иммобилизованные на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Последовательность олигонуклеотида
*35S*_и	промотор 35S	5' GCC ATC ATT GCG ATA AAG G
*gus*_и	ген *gus*	5' CTG GTA TCA GCG CGA A
*nos*_и	промотор *nos*	5' GCT AAG CAC ATA CGT CAG AA
*npt*_и	ген *npt*II	5' GGC AGC GCG GCT ATC
*ocs*_и	терминатор *ocs*	5' TTC TGT TGT GCA CGT TGT A
Примечание. Индекс «_и» означает «иммобилизованный».		

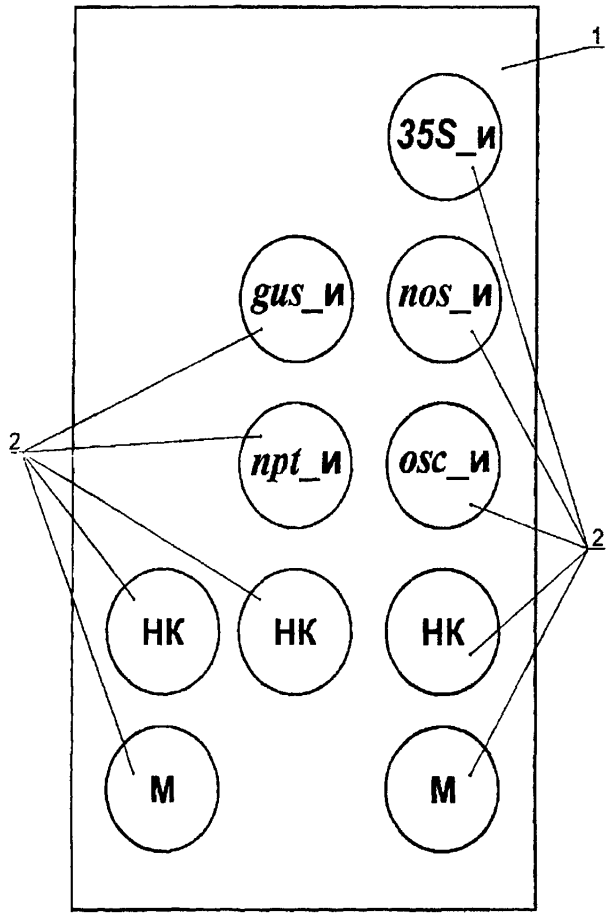

Рис.1. Схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения.

1 – предметное стекло; 2 – гелевые ячейки.

Биологический микрочип представляет собой стандартное предметное стекло по ГОСТ 9284 для световой микроскопии, на поверхности которого в определенном порядке расположены 10 микроскопических ячеек (рис. 1), заполненных полиакриламидным гелем. Каждая из пяти верхних ячеек содержит индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (*35S*, *gus nos*, *npt или ocs*). Три ячейки с индексом «НК» не содержат ранее перечисленных индивидуальных ковалентно иммобилизованных олигонуклеотидов и выполняют роль отрицательного контроля гибридизации. Две ячейки с индексом «М» содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для однозначной ориентации биологического микрочипа. Поверхность биологического микрочипа с ячейками должна быть закрыта пластиковой крышкой с отверстиями, которая вместе с предметным стеклом образует замкнутое пространство, предназначенное для проведения гибридизации анализируемой пробы.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных выше.

5. Отбор проб

Отбор проб проводят по межгосударственным и национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп растительного сырья (в т. ч. посевного материала, цветов) и пищевых продуктов.

6. Подготовка к проведению анализа

6.1. Приготовление растворов

6.1.1. Приготовление раствора NaOH концентрации 40 г/дм^3.

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

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

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

6.1.3. Приготовление 70 %-ного раствора этилового спирта.

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

6.1.4. Приготовление гибридизационного буфера.

В стеклянный стакан или плоскодонную колбу вместимостью 300—500 см^3 помещают точно отмеренные количества: 44,33 (± 0,01) г гуанидин тиоцианата – по п. 4.33 [14], 4,88 (± 0,01) г N-[2-гидроксиэтил]пиперазин N'-[2-этансульфоновой кислоты] натриевой соли (HEPES) по п. 4.34 [15]. Затем стеклянной пипеткой по ГОСТ 29227 вместимостью 5 см^3 приливают 3,75 (± 0,05) см^3 раствора ЭДТА, приготовленного по

п. 6.1.2, и цилиндром вместимостью 250 см^3 добавляют 200 см^3 особо чистой стерильной воды. Стакан с раствором помещают на магнитную мешалку по п. 4.9 [6] и перемешивают до полного растворения компонентов. Доводят значение pH буфера до 7,5 (± 0,1) добавлением раствора гидроокиси натрия, приготовленного по п. 6.1.1. Полученный раствор из стакана переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3, доводят объем до метки особо чистой стерильной водой и разливают по 50 см^3 в плоскодонные колбы с притертыми пробками. Срок хранения при температуре 2—8 °С – не более 12 мес.

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

В колбу вместимостью 100 см^3 помещают 24,22 г Трис (оксиметил) аминометана по п. 4.25 [11] и растворяют приблизительно в 80 см^3 особо чистой стерильной воды. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5, а объем – до 100 см^3 особо чистой стерильной водой. Срок хранения при комнатной температуре – не более 6 мес.

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

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

6.1.7. Приготовление раствора 20 %-ного додецилсульфата натрия (SDS) [12].

В стеклянную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 20 г сухого додецилсульфата натрия по п. 4.28 и добавляют 80 см^3 особо чистой стерильной воды. Растворяют при плавном перемешивании на магнитной мешалке и одновременном нагревании до температуры 40—50 °С до полного растворения. Срок хранения при комнатной температуре – не более одного года.

6.1.8. Приготовление буфера экстракции.

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

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

6.2. Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК)

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

6.2.2. Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по п. 6.2.1, интенсивно встряхивают в течение 5 с на аппарате для встряхивания по п. 4.10 [7], быстро нагревают на водяной бане [19] до температуры 65 °С и выдерживают при этой температуре 15—20 мин, периодически осторожно перемешивая содержимое.

6.2.3. Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по п. 6.2.2, центрифугируют при комнатной температуре в настольной центрифуге по п. 4.8 [5] при частоте вращения 13 000 мин$^{-1}$ в течение 5 мин.

6.2.4. Надосадочную жидкость, полученную по п. 6.2.3, отбирают по 300 мм^3 и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, содержащие по 300 мм^3 изопропилового спирта по ГОСТ 9805. Содержимое перемешивают, выдерживают 5 мин при комнатной температуре и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13 000 мин$^{-1}$.

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

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

6.3. Подготовка асимметричной мультиплексной ПЦР.

6.3.1. Приготовление реакционной смеси для амПЦР*.

6.3.1.1. В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см^3 микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 3 мм^3 10× буфера реакционного для ПЦР по п. 4.32; 3 мм^3 смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по п. 4.36 [16], 2,5 мм^3 фермента Taq-полимеразы по п. 4.31 [13] (концентрацией 5 ед. акт/мм^3)**, а также водный раствор праймеров по п. 4.40 [20] в следующих концентрациях (нг/дм^3):

*35S*_п/35S_оф – 15,32 / 81,02;
*gus*_п/*gus*_оф – 3,75 / 37,59;
*nos*_п/*nos*_оф – 3,61 / 84,74;
*npt*_п/*npt*_оф – 7,51 / 36,01;
*ocs*_п/*ocs*_оф – 8,18 / 41,41.

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

6.3.1.2. Реакционную смесь для амПЦР, полученную по п. 6.3.1.1, осаждают кратковременным (10—15 с) центрифугированием на настольной центрифуге при частоте вращения 1 500—3 000 мин$^{-1}$ и сразу же используют для проведения анализа.

6.3.2. Все этапы амПЦР должен проводить квалифицированный, специально обученный персонал в соответствии с требованиями [22]. Для проведения амПЦР допускается использовать только стерильную лабораторную посуду и новые стерильные микроцентрифужные пробирки. При проведении амПЦР каждую микроцентрифужную пробирку открывают только перед отбором или внесением анализируемой пробы, а по окончании манипуляции сразу же закрывают. Запрещается открывать одновременно несколько микроцентрифужных пробирок с анализируемыми пробами и оставлять их открытыми длительное время. Каждую анализируемую пробу отбирают микродозатором с новым стерильным наконечником с фильтром.

---

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

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

7. Проведение анализа

7.1. Проведение асимметричной мультиплексной ПЦР

7.1.1. Реакционную смесь для амПЦР, полученную по п. 6.3.1.2, микродозатором вносят в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 $см^3$, по 27 $мм^3$ в каждую.

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

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

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

Таблица 2

Программа проведения амПЦР

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

7.2. Гибридизация на биологическом микрочипе

7.2.1. В необходимое количество микроцентрифужных пробирок микродозатором вносят по 24 $мм^3$ гибридизационного буфера, приготовленного по п. 6.1.4. Затем к гибридизационному буферу добавляют по 12 $мм^3$ водной фазы ПЦР-смеси, полученной в результате проведения амПЦР по п. 7.1.4 и перемешивают в течение 20—30 с на аппарате для встряхивания по п. 4.10 с частотой вращения не менее 1 500 $мин^{-1}$ для получения гибридизационной смеси.

7.2.2. Из каждой микроцентрифужной пробирки микродозатором отбирают по 28 $мм^3$ гибридизационной смеси (для каждого биологического микрочипа), полученной по п. 7.2.1, и помещают на поверхность биологического микрочипа, через отверстие в пластиковой крышке. Гибридизацию проводят в термостате [4] при температуре 37 °С в течение 18 ч.

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

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения приведена в прилож. Б.

8. Обработка результатов анализа

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

8.2. Полученную на экране компьютера гибридизационную картину для анализируемой пробы сравнивают с гибридизационной картиной для положительного контроля (заведомо трансгенной ДНК) и гибридизационной картиной для отрицательного контроля (заведомо нетрансгенной ДНК). Пример гибридизационной картины флуоресцентных продуктов амПЦР в гелевых ячейках биологического микрочипа приведен в прилож. В. Наличие высокого уровня специфического флуоресцентного сигнала в гелевых ячейках биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды (для промоторов *35S* и *nos*, терминатора *ocs*, генов *gus* или *nptII*), свидетельствует о присутствии конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о трансгенности анализируемой ДНК. Низкий уровень флуоресцентных сигналов в гелевых ячейках биологического микрочипа после гибридизации, сравнимый с уровнем фоновой флуоресценции отрицательного контроля, но не выше установленного порога чувствительности в программе Imageware, указывает на отсутствие конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о нетрансгенности анализируемой ДНК.

8.3. Интерпретация результатов.

8.3.1. Высокий уровень флуоресценции одной, нескольких или всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, превышающий заданный в программе Imageware [1] порог чувствительности, свидетельствует о наличии генетически модифицированных источников (ГМИ) в анализируемом продукте.

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

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

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

9. Требования безопасности

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

9.2. Помещение, в котором проводятся работы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать гигиенические нормативы, установленные Минздравом России [23, 24].

9.3. При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.019. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

9.4. Исследования по идентификации ГМИ растительного происхождения могут проводиться на базе лабораторий, проводящих исследования методом ПЦР с патогенными биологическими агентами. В таком случае должно быть предусмотрено лишь разграничение проведения исследований во времени. При организации исследований по идентификации ГМИ необходимо предусмотреть наличие вспомогательных помещений (комнаты ведения учетной документации; раздевалки для сотрудников; комнаты приема пищи; туалета; подсобных помещений), которые могут быть общими с другими подразделениями учреждения. Проведение исследований методом ПЦР сопряжено с необходимостью обеспечения соблюдения правил биологической безопасности и требований к организации и проведению анализа с целью предотвращения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [22].

Приложение А
(справочное)

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

Приложение Б
(справочное)

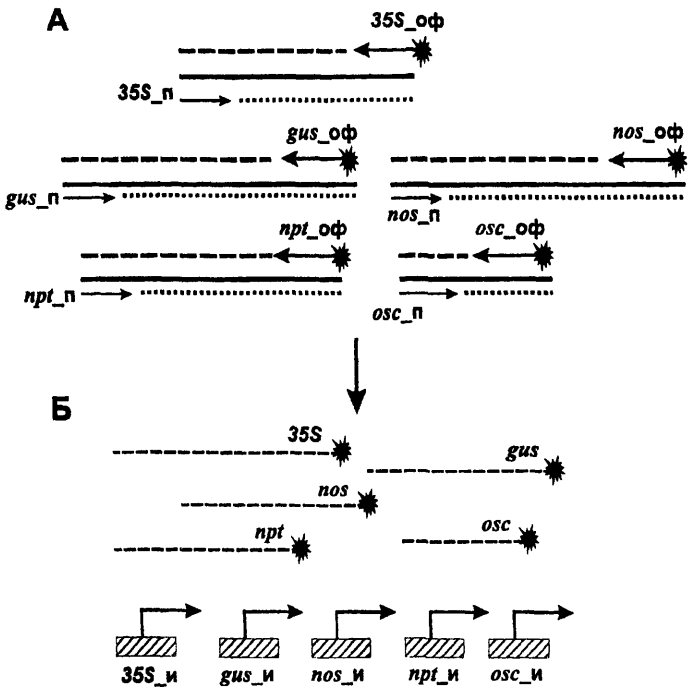

Рис. Б1. Схема метода идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения.

А – асимметричная мультиплексная ПЦР с использованием флуоресцентно-меченных праймеров (индекс «_оф»);

Б – гибридизация ПЦР продуктов со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на биологическом микрочипе (индекс «_и»).

Приложение В
обязательное)

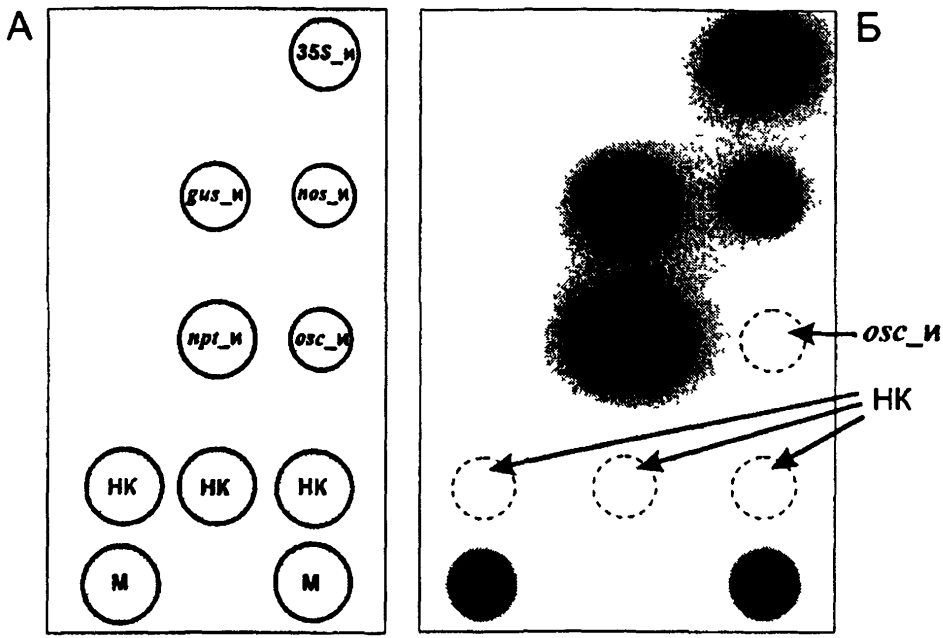

Рис. В1. Пример гибридизационной картины на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР (гибридизационная картина на экране компьютера, полученная в результате анализа генетически модифицированного картофеля, содержащего промотор *35S*, гены *gus* и *nptII* и промотор *nos*).

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

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

Приложение Г
(справочное)

Библиография

[1]	Центр биологических микрочипов РАН ИМБ	Компьютерная программа «Imageware» для анализа изображений, полученных с помощью «Чипдетектора-03»
[2]	ТУ 9443-001-02699501—03	Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов «Чипдетектор-03»
[3]	ТУ 9642-001-4648062—98	Амплификатор «Терцик МС-2»
[4]	ТУ 42-619—61	Термостат суховоздушный ТВЗ-25
[5]	Корпорация «Эппендорф», кат. № 5425000.014	Микроцентрифуга настольная 5415С 13 000 $мин^{-1}$
[6]	Корпорация «Хеликон», кат. № MSH-300	Мешалка магнитная с подогревом
[7]	Корпорация «Хеликон», № CV-1500	Аппарат для встряхивания кат. (центрифуга-вортекс)
[8]	Корпорация «Хеликон», кат. № RP-30 и RP-80	Штативы под микроцентрифужные пробирки
[9]	Корпорация «Хеликон», кат. № FA 104; FA 108; FA 111; FA 113N	Наконечники с фильтром для микропипеток
[10]	ТУ 6-09-11-1721—83	Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль дигидрат
[11]	ТУ 6-09-4292—76	Трис(оксиметил)аминометан[$NH_2C(CH_2OH)_3$]
[12]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № L-6026	Додецилсульфат натрия (SDS)
[13]	Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 1806	Фермент Taq-полимераза 5 ед. акт./$мм^3$
[14]	Корпорация «Хеликон», кат. № Am-038-0.5	Гуанидин тиоцианат [CH_3N_3-HSCN]
[15]	Корпорация «Хеликон», кат. № Am-0485-Ol	N-[2-оксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [$C_8H_{17}N_2O_4SNa$]
[16]	Корпорация «Хеликон», кат. № Н-4044-0.4	Раствор смеси дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по 25 мл каждого
[17]	ИФР РАН	Раствор заведомо трансгенной ДНК около 100 нг/$мм^3$ или 10^6 копий/$мм^3$
[18]	ИФР РАН	Раствор заведомо нетрансгенной ДНК около 100 нг/$мм^3$ или 10^6 копий/$мм^3$
[19]	ТУ 46-22-603—75	Баня водяная с электрическим или огневым подогревом

[20]	Центр биологических микрочипов ИМБ РАН	Раствор водный праймеров «ПР-1»
[21]	Центр биологических микрочипов ИМБ РАН	Микрочипы гелевые с иммобилизованными олигонуклеотидами
[22]	Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения	Государственный комитет санэпиднадзора Российской Федерации; № 06-19/52-17 от 02.06.95
[23]	Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. ГН 2.2.5.1313—03	Минздрав России. М., 2003
[24]	Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны. ГН 2.2.5.1314—03	Минздрав России. М., 2003

gost.e-ecolog.ru