ГОСТ Р 52174—2003

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биологическая безопасность

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

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

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 447 «Биологическая безопасность пищевых продуктов, кормов и товаров народного потребления и методы ее контроля»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 декабря 2003 г. № 403-ст

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

4 ИЗДАНИЕ (июнь 2005 г.) с Поправкой (ИУС 9—2005)

© ИПК Издательство стандартов, 2004
© Стандартинформ, 2005

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биологическая безопасность

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

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

Biological safety. Raw and food-stuffs. Method for the identification of genetically modified organisms (GMO) of plant origin by using biological microchip

Дата введения 2004—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевое сырье (в том числе 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.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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

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

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

ГОСТ 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

Издание официальное

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—2001 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. Часть 1. Общие требования
ГОСТ Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

3 Определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **биологическая безопасность:** В соответствии с приложением 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 том числе 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] или «Био-1» [23].

4.2 Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов типа «Чипдетектор-03» [2] или «Евробио-ВТО» [24].

4.1, 4.2 **(Поправка).**

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 ТВ3-25 с рабочей температурой 37 °С, рабочий диапазон от 20 °С 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 допускаемой 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 13000 $мин^{-1}$ [5].

4.9 Мешалка магнитная с подогревом [6].

4.10 Аппарат для встряхивания типа CV-1500 с частотой вращения не менее 1500 $мин^{-1}$ [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—1000 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; 1000 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 1000 см^3.

4.18 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические по ГОСТ 25336 вместимостью 50—1000 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, х.ч.

4.23 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.

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

4.25 Трис(оксиметил)аминометан [11].

4.26 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ Р 51652, х.ч.

4.27 Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, х.ч.

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 °С—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 35*S* 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 *nptII* из транспозона 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:*

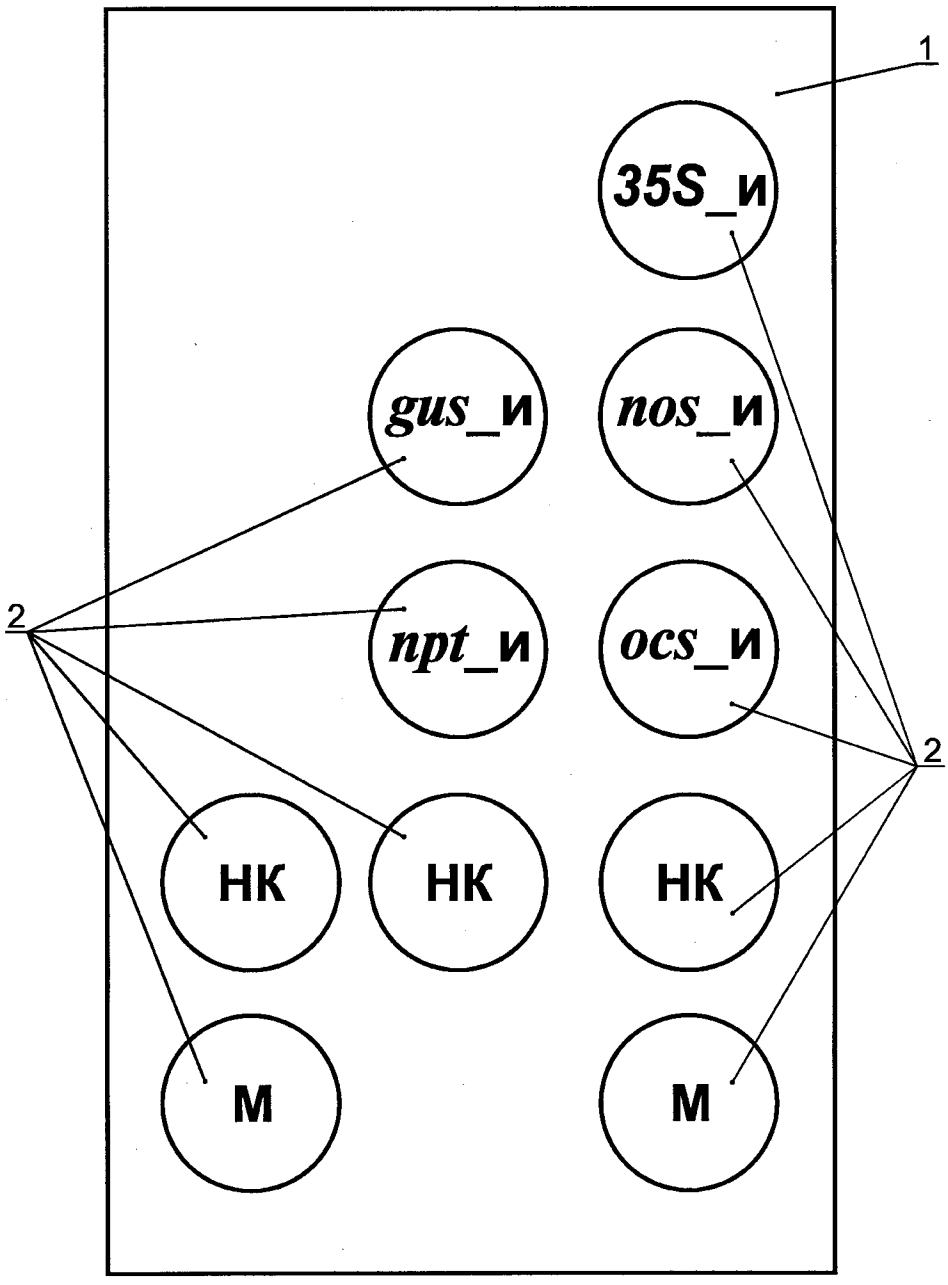
*ocs*_п	5′ GCG AGA CGC CTA TGA TCG CAT GAT	(24 н.о.)
*ocs*_оф	5′ GAA ACC GGC GGT AAG GAT CTG AGC	(24 н.о.)

Примечание — В обозначениях праймеров индекс «_п» означает «прямой», индекс «_оф» означает «обратный флуоресцентномеченый»; н.о. — нуклеотидные остатки [20].

4.41 Биологический микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами, приведенными в таблице 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 *nptII*	5′ GGC AGC GCG GCT ATC
*ocs*_и	Терминатор *ocs*	5′ TTC TGT TGT GCA CGT TGT A
Примечание — Индекс «_и» означает «иммобилизованный».		



1 — предметное стекло;
2 — гелевые ячейки

Рисунок 1 — Схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения

Биологический микрочип представляет собой стандартное предметное стекло по ГОСТ 9284 для световой микроскопии, на поверхности которого в определенном порядке расположены 10 микроскопических ячеек (рисунок 1), заполненные 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.

(Поправка).

5 Отбор проб

Отбор проб проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевого сырья (в том числе посевного и посадочного материала), пищевых продуктов, цветов.

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 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 4.24, растворяют в 80 см^3 особо чистой стерильной воды при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке [6]. Затем раствором гидроокиси натрия по 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 °С—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 °С—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 4.33 [14], 4,88 (±0,01) г N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N′-[2-этансульфоновой кислоты] натриевой соли (HEPES) по 4.34 [15]. Затем стеклянной пипеткой по ГОСТ 29227 вместимостью 5 см^3 приливают 3,75 (±0,05) см^3 раствора ЭДТА, приготовленного по 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 4.9 [6] и перемешивают до полного растворения компонентов. Доводят значение pH буфера до 7,5 (±0,1) добавлением раствора гидроокиси натрия, приготовленного по 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 °С—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 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 4.27 и добавляют 80 $см^3$ особо чистой стерильной воды. Растворяют при плавном перемешивании на магнитной мешалке и одновременном нагревании до температуры 40 °С—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 6.1.5, 5 $см^3$ раствора NaCl, приготовленного по 6.1.6, 1,25 $см^3$ раствора 20 %-ного SDS, приготовленного по 6.1.7, и 2,5 $см^3$ раствора ЭДТА, приготовленного по 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 °С—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 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 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 6.1.8.

6.2.2 Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 6.2.1, интенсивно встряхивают в течение 5 с на аппарате для встряхивания по 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 6.2.2, центрифугируют при комнатной температуре в настольной центрифуге по 4.8 [5] при частоте вращения 13000 $мин^{-1}$ в течение 5 мин.

6.2.4 Надосадочную жидкость, полученную по 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 13000 $мин^{-1}$.

6.2.5 Надосадочную жидкость по 6.2.4 тщательно удаляют микродозатором, а осадок ДНК, полученный по 6.2.4, промывают 1 $см^3$ 70 %-ного этилового спирта, приготовленного по 6.1.3 и охлажденного до температуры 0 °С—4 °С, центрифугируют аналогично 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 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 4.32; 3 $мм^3$ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.36 [16], 2,5 $мм^3$ фермента Taq-полимеразы по 4.31 [13] (концентрацией 5 Ед. акт/$мм^3$)**, а также водный раствор праймеров по 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.

---

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

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

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 4.37) и отрицательный контроль (заведомо нетрансгенная ДНК по 4.38).

6.3.1.2 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 6.3.1.1, осаждают кратковременным (10—15 с) центрифугированием на настольной центрифуге при частоте вращения 1500—3000 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.

7 Проведение анализа

7.1 Проведение асимметричной мультиплексной ПЦР

7.1.1 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 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 6.2, вносят микродозатором по 3 мм^3 в микроцентрифужные пробирки с реакционной смесью для амПЦР по 7.1.1. При использовании амплификатора ДНК по 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 7.1.2, и растворами, подготовленными по 7.1.3, помещают в амплификатор ДНК и проводят амПЦР по программе, указанной в таблице 2.

Таблица 2 — Программа проведения амПЦР

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Число циклов
1	95	5 мин	1
2	95	30 с	37
	62	30 с	
	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 6.1.4. Затем к гибридизационному буферу добавляют по 12 мм^3 водной фазы ПЦР-смеси, полученной в результате проведения амПЦР по 7.1.4, и перемешивают в течение 20—30 с на аппарате для встряхивания по 4.10 с частотой вращения не менее 1500 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 7.2.1, и всю смесь 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 приложении 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] или «Био-1» [23].

(Поправка).

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 приложении В. Наличие высокого уровня специфического флуоресцентного сигнала в гелевых ячейках биологического микрочипа, содержащих иммобилизационные 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 норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

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

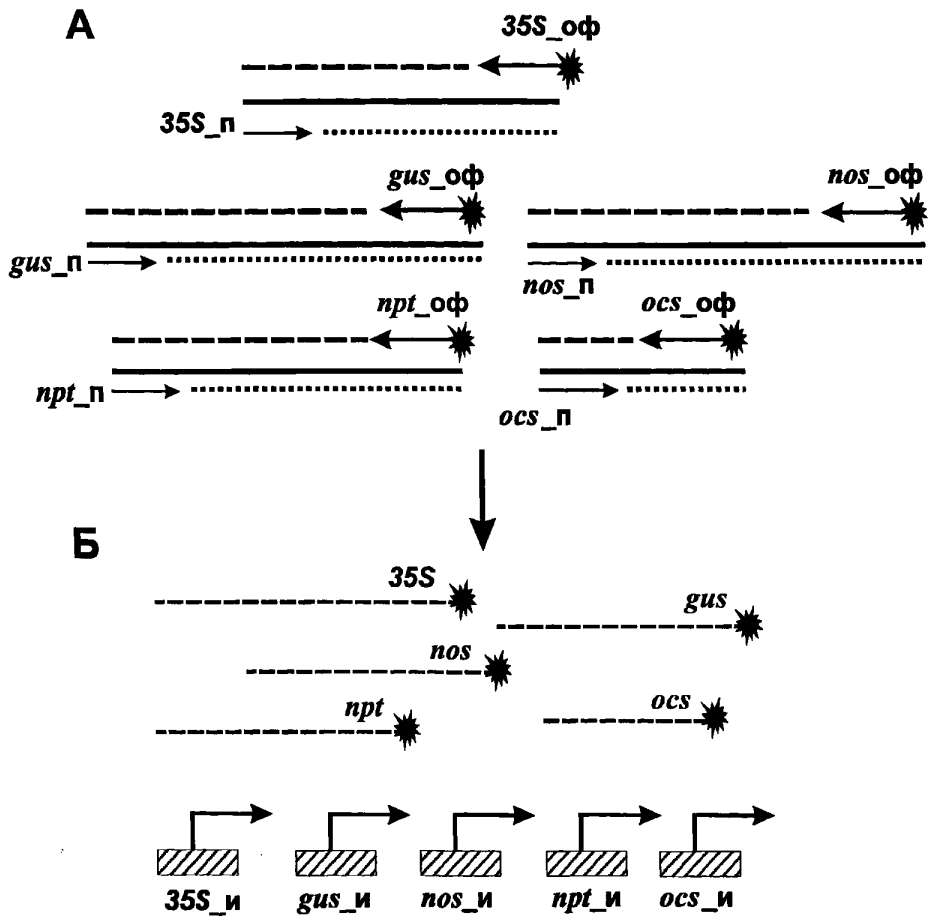
ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Определение термина

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)

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения



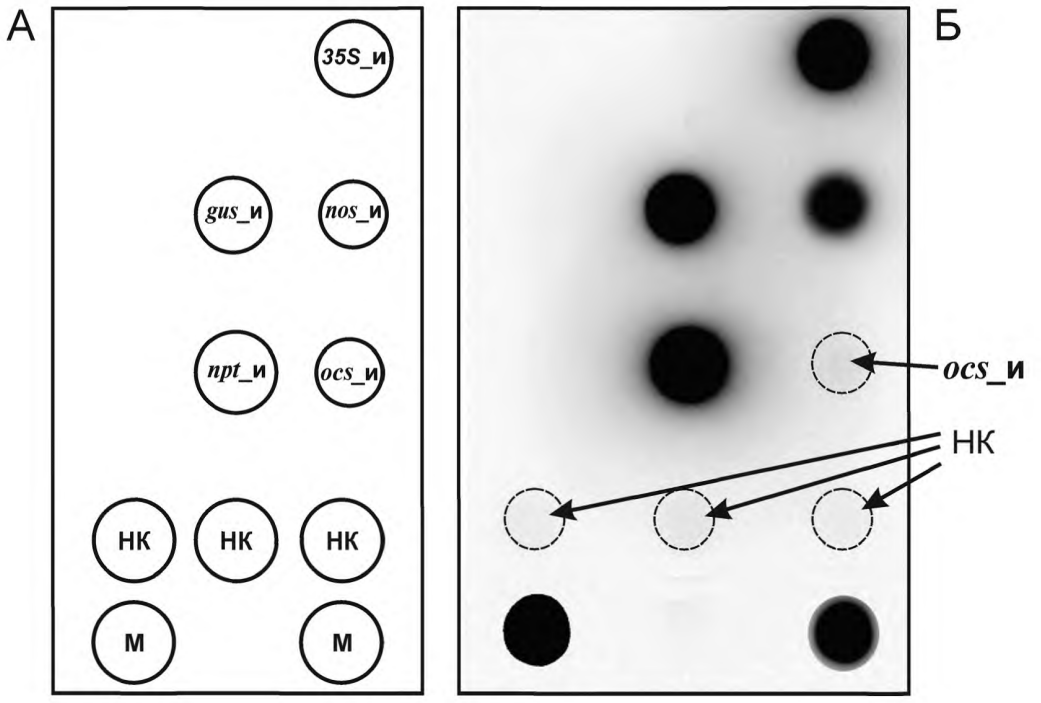
А — амПЦР с использованием флуоресцентно-меченных праймеров (индекс «_оф»);

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

Рисунок Б.1

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(обязательное)

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

Рисунок В.1

ПРИЛОЖЕНИЕ Г
(рекомендуемое)

Пример оформления протокола испытания

Наименование организации (испытательная лаборатория)

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от «____» _____ 200__г.

Даты: поступления на испытание « ___ » _____ 200___ г.

конца испытаний « ___ » _____ 200___ г.

Продукция: Картофель семенной

Производитель сырья или продукции ООО «Вымпел»

Предъявитель сырья или продукции «Биотест-М»

Отбор проб произведен ГОСТ 11856—89
(в соответствии с нормативным документом на соответствующую однородную группу сырья или продукции)

Акт отбора проб и техническое задание на испытания № 5 от 01.12.200 г.

Испытания проведены на основании требований ГОСТ Р 52174—2003

Номер образца 6/2004, 7/2004, 8/2004 и 9/2004

Характеристика испытуемого образца (маркировка, вид и состояние упаковки, этикетки, штриховка) —

Маркировка —

Годен до _____ Штриховой код _____

Результаты испытаний

Номер образца	Трансгенные последовательности				
	35S	*gus*	*nos*	*nptII*	*ocs*
6/2004	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
7/2004	Присутствует	Присутствует	Отсутствует	Присутствует	Присутствует
8/2004	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
9/2004	Присутствует	Отсутствует	Присутствует	Отсутствует	Отсутствует

Результат анализа: В образцах 7/2004 и 9/2004 обнаружены следующие трансгенные компоненты: в образце № 7/2004 обнаружены гомологи генов *gus* и *nptII*; промоторы *35S, ocs,* а в образце № 9/2004 обнаружены промоторы *35S* и *nos*. В образцах № 6/2004 и 8/2004 трансгенные компоненты не обнаружены. Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ в образцах № 6/2004, 7/2004 и 8/2004 отсутствует, а в образце № 9/2004 присутствует.

Исполнители

_____ _____

подпись фамилия, инициалы

_____ _____

подпись фамилия, инициалы

Руководитель испытательной лаборатории _____

подпись

МП

_____

фамилия, инициалы

Заключение распространяется на образец, представленный на испытания.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д
(справочное)

Библиография

[1]	Центр биологических микрочипов ИМБ РАН	Компьютерная программа «Imageware» для анализа изображений, полученных с помощью «Чипдетектора-03»
[2]	ТУ 9443-001-02699501—2003	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 ТВ3-25
[5]	Корпорация «Эппендорф», кат. № 5425000.014	Микроцентрифуга настольная 5415С, 13000 мин$^{-1}$
[6]	Корпорация «Хеликон», кат. № MSH-300	Мешалка магнитная с подогревом
[7]	Корпорация «Хеликон», кат. № CV-1500	Аппарат для встряхивания (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-0485-01	N-[2-оксиэтил]пиперазин-N′-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [$C_8H_{17}N_2O_4SNa$]
[16]	Корпорация «Хеликон», кат. № H-4044-0.4	Раствор смеси дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по 25 мМ 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 15.06.95
[23]	ООО «Биоконтроль»	Компьютерная программа «Био-1»
[24]	ООО «Биоконтроль»	Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции «Евробио-ВТО»

ПРИЛОЖЕНИЯ Б—Д **(Поправка).**

УДК 663/.664:543.06:006.354	ОКС	65.140	H11	C11	ОКСТУ 9109
		65.160	H13	C23—C25	9209
		67.060	H17	C32—C36	9709
		67.080	H23	C41—C45	
		67.100	H31—H34	C52	
		67.120	H36		
		67.140	H41—H43		
		67.140.30	H51—H56		
		67.160	H62		
		67.180	H65		
		67.190	H68		
		67.200	H72—H74		
		67.220	H81		
			H97		

Ключевые слова: идентификация, сырье и продукты пищевые, генетически модифицированные источники, асимметричная мультиплексная полимеразная цепная реакция, биологический микрочип, гибридизация, праймер, олигонуклеотиды, последовательность ДНК, нетрансгенная ДНК, трансгенная ДНК, интенсивность флуоресценции

Редактор *В.Н. Копысов*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *А.С. Черноусова*
Компьютерная верстка *Е.Н. Мартемьяновой*

Подписано в печать 19.07.2005. Формат 60×84$^1/_8$. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,60. Тираж 859 экз. Зак. 460. С 1521.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

Набрано в ИПК Издательство стандартов на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «Стандартинформ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru