ГОСТ Р 52173—2003

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (гми) растительного происхождения

Издание официальное

БЗ 8—2002/139

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением Научно-исследовательским институтом питания РАМН (ГУ НИИ питания РАМН), Центром «Биоинженерия» РАН

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 29 декабря 2003 г. № 402-ст

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ИПК Издательство стандартов, 2004

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определения 2
4 Аппаратура, материалы и реактивы 2
5 Отбор проб 3
6 Подготовка к проведению анализа 4
7 Проведение анализа 6
8 Обработка результатов анализа 7
9 Контроль результатов идентификации 8
10 Требования безопасности 8
Приложение А Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (промотор *35S*) 9
Приложение Б Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (терминатор *nos*) . . . 10
Приложение В Библиография 11

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

Raw material and food-stuffs. Method for the identification of genetically modified organisms (GMO) of plant origin

Дата введения 2005—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые сырье и продукты (далее — продукт) и устанавливает метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения.

Метод основан на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с соответствующими праймерами.

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 вентилляционные. 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 9656—75 Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

Издание официальное

2—725

ГОСТ 14919—83 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия.

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 Р 51652—2000 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

3 Определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **генетически модифицированные источники пищи:** Продукты (компоненты), используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде, полученные из генетически модифицированных организмов.

3.2 **генетически модифицированный организм:** Организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии или содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинацию генов.

3.3 **генная инженерия:** Совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

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

4.2 Прибор для горизонтального электрофореза типа «Mini-Sub Cell GT System» с комплектом кювет и гребенок [2].

4.3 Источник напряжения типа «Power Pac 300» с диапазоном регулируемого напряжения 50—300 В [3].

4.4 Видеосистема типа «Gel Doc 2000™», предназначенная для ввода в компьютер, анализа и документирования изображений люминисцирующих следов ДНК в гелях, окрашенных бромистым этидием: диапазон излучения 300—400 нм, чувствительность — не менее 10 нг ДНК (по бромистому этидию) [4].

4.5 Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

4.6 Камера морозильная, обеспечивающая температуру минус 20 °С.

4.7 Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф (частота вращения не менее 12000 $мин^{-1}$) [5].

4.8 Термостат типа «TERMO 24-15» под микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 $см^3$, диапазон температур от 15 °С до 120 °С, количество гнезд — не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры — 0,2 °С, разность температур между соседними ячейками — не более 0,5 °С [6].

4.9 Аппарат для встряхивания типа «Вортекс», скорость вращения 250—3000 $мин^{-1}$.

4.10 Печь микроволновая (мощностью не менее 400 Вт).

4.11 Весы лабораторные общего назначения высокого класса точности (условное обозначение (II)) с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104.

4.12 Баня водяная [7].

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

4.14 Дозаторы с переменным объемом дозирования:

0,2—2,0 $мм^3$, шагом 0,01 $мм^3$, точностью ±1,2 %;

0,5—10,0 мм³, шагом 0,01 мм³, точностью ±0,8 %;
2—20 мм³, шагом 0,01 мм³, точностью ±0,8 %;
20—200 мм³, шагом 0,1 мм³, точностью ±0,6 %;
100—1000 мм³, шагом 1 мм³, точностью ±3 %;
2—10 см³, шагом 0,1 см³, точностью ±0,5 %.

4.15 Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см³.

4.16 Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10; 20; 200; 1000 мм³; 10 см³.

4.17 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 25; 50; 100; 200; 1000 см³ по ГОСТ 12738.

4.18 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные на 25; 100; 1000 см³ по ГОСТ 1770.

4.19 Пестик тефлоновый или стеклянная палочка по ГОСТ 21400 под размер микроцентрифужной пробирки вместимостью 1,5 см³.

4.20 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

4.21 Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

4.22 Кислота борная по ГОСТ 9656, х. ч.

4.23 Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), х. ч. [8].

4.24 Гексадецилтриметиламмониум бромид [9].

4.25 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

4.26 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

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

4.28 Спирт изопропиловый, х. ч. [10].

4.29 Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.

4.30 Хлороформ по ГОСТ 20015, х. ч.

4.31 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.32 Вода деионизированная [11].

4.33 Трис (оксиметил) аминометан, х. ч. [12].

4.34 2-меркаптоэтанол, х. ч. [13].

4.35 Этидий бромистый, х. ч. [14].

4.36 Альбумин бычий сывороточный сухой (БСА) [15].

4.37 Термостабильный фермент Taq-полимераза, оптимум работы в области 70 °С — 72 °С [16].

4.38 ПЦР буфер [17].

4.39 Агароза для электрофореза (тип II) [18].

4.40 Маркер молекулярной массы ДНК [19].

4.41 Стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0) [20].

4.42 Стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5) [21].

4.43 Нуклеотиды:

2'-дезоксиаденозин-5' трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (АТФ) [22];
2'-дезоксицитидин-5' трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ) [23];
2'-дезоксигуанозин-5' трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ГТФ) [24];
2'-дезокситимидин-5' трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ТТФ) [25];

4.44 Праймеры на промотор *35S* [26]:

35S-1 5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3';
35S-2 5'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'.

4.45 Праймеры на терминатор *nos* [27]:

nos-1 5'GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3';
nos-2 5'TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'.

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

5 Отбор проб

Отбор проб проводят по национальным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевого сырья и пищевых продуктов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление раствора концентрацией *c* (Трис-HCl)=1 моль/дм³

В мерную колбу по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см³ помещают 12,11 г Трис (оксиметил) аминометана по 4.33, [12] растворяют в приблизительно 80 см³ деионизированной воды по 4.32, [11]. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5, затем доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Срок хранения в холодильнике по ГОСТ 26678 при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.2 Приготовление раствора концентрацией *c* (NaCl) = 5 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 29,22 г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в приблизительно 80 см³ деионизированной воды, доводят до метки деионизированной водой и перемешивают. Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.3 Приготовление раствора концентрацией *c* (NaOH) = 30 %

В колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 50 см³ помещают 3 г гидроокиси натрия по ГОСТ 4328, растворяют в 7 см³ деионизированной воды. Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.4 Приготовление раствора концентрацией *c* (ЭДТА) = 0,5 моль/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 14,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты по 4.23, [8], растворяют в приблизительно 80 см³ деионизированной воды. Раствором гидроокиси натрия, приготовленным по 6.1.3, доводят pH раствора до 8,0, деионизированной водой доводят до метки и перемешивают.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.5 Приготовление лизирующего буфера

В мерную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 25 см³ помещают 0,5 г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 10 см³ деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 2,5 см³ раствора Трис-HCl, приготовленного по 6.1.1, 7 см³ раствора хлористого натрия, приготовленного по 6.1.2, 1 см³ раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.4, доводят деионизированной водой до метки, перемешивают.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес. В случае выпадения осадка при хранении раствор выдерживают при комнатной температуре или подогревают в термостате по 4.8, [6] при температуре 65 °С до полного растворения.

Непосредственно перед использованием в приготовленный раствор добавляют автоматическим микродозатором меркаптоэтанол по 4.34, [13] из расчета 4 мм³ на 1 см³ лизирующего буфера и перемешивают.

6.1.6 Приготовление хлороформа, насыщенного водой

В колбу вместимостью 200 см³ вносят цилиндром по ГОСТ 1770 100 см³ хлороформа по ГОСТ 20015, добавляют 20 см³ деионизированной воды по ГОСТ 6709, тщательно перемешивают и оставляют на 24 ч для насыщения.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.7 Приготовление 70 %-ного раствора этилового ректификованного спирта

В колбу вместимостью 200 см³ вносят цилиндром 70 см³ 96 %-ного этилового ректификованного спирта по ГОСТ Р 51652, добавляют 26 см³ деионизированной воды и перемешивают.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 6 мес.

6.1.8 Приготовление раствора концентрацией *c* (БСА) = 20 мкг/см³

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 см³ помещают 0,002 г сухого БСА по 4.36, [15], добавляют 1 см³ деионизированной воды, перемешивают до полного растворения. Отбирают 10 мм³ приготовленного раствора и переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 см³, добавляют 1 см³ деионизированной воды и перемешивают.

Срок хранения в морозильной камере при температуре минус 20 °С — не более 1 мес.

6.1.9 Приготовление смеси нуклеотидов концентрацией *c* = 4 ммоль/дм³

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,2 см³ вносят 96 мм³ деионизированной воды, 1 мм³ АТФ (концентрацией 100 ммоль/дм³) по 4.43, [22], 1 мм³ ГТФ (концентрацией 100 ммоль/дм³) по 4.43, [24], 1 мм³ ЦТФ (концентрацией 100 ммоль/дм³) по 4.43, [23], 1 мм³ ТТФ (концентрацией 100 ммоль/дм³) по 4.43, [25], смесь перемешивают.

Срок хранения при температуре минус 20 °С — не более одного года.

6.1.10 Приготовление 1·ТВЕ буфера для электрофореза

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 10,8 г Трис (оксиметил) аминометана, 5,5 г борной кислоты по ГОСТ 9656 и 0,92 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают до полного растворения.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 1 мес.

6.1.11 Приготовление раствора концентрацией c ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 10 мг/см^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 1 г бромистого этидия по 4.35, [14], растворяют и доводят до метки дистиллированной водой.

Срок хранения при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 12 мес.

6.1.12 Приготовление 2 %-ного агарозного геля

6.1.12.1 В плоскодонную стеклянную колбу вместимостью не менее 200 см^3 помещают 1 г агарозы по 4.39, [18], добавляют 50 см^3 буфера 1·ТВЕ, приготовленного по 6.1.10, тщательно перемешивают взбалтыванием. Колбу со смесью нагревают в микроволновой печи по 4.10 или на водяной бане при температуре 100 °С и кипятят до полного расплавления агарозы.

6.1.12.2 Расплавленную агарозу, приготовленную по 6.1.12.1, охлаждают при комнатной температуре до 50 °С, автоматическим микродозатором добавляют 5 мм^3 раствора бромистого этидия, приготовленного по 6.1.11, тщательно перемешивают круговыми движениями.

6.1.12.3 Однородную смесь, полученную по 6.1.12.2, разливают в кюветы для электрофореза и с помощью гребенки формируют карманы. Через 15—30 мин после остывания геля гребенку удаляют.

Допускается хранение геля в 1·ТВЕ буфере для электрофореза, приготовленного по 6.1.10, в холодильнике при температуре от 4 °С до 5 °С — не более 7 сут.

6.2 Подготовка пробы

6.2.1 Две навески анализируемого продукта, навеску стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0) по 4.41, [20] и навеску стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5) по 4.42, [21] массой от 70 до 80 мг каждая помещают в четыре микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 см^3. С помощью дозатора добавляют в каждую по 200 мм^3 лизирующего буфера с меркаптоэтанолом по 6.1.5 и немедленно тефлоновым пестиком растирают смесь до получения однородной массы. В каждую микроцентрифужную пробирку добавляют по 600 мм^3 лизирующего буфера с меркаптоэтанолом. Смесь тщательно перемешивают тефлоновым пестиком, не допуская образования комков. Затем смесь перемешивают в течение 30 с на аппарате для встряхивания типа «Вортекс».

6.2.2 Приготовленные по 6.2.1 смеси помещают в термостат, инкубируют при температуре 65 °С 40—60 мин, после чего повторно перемешивают 30 с на аппарате для встряхивания и центрифугируют 7 мин на настольной микроцентрифуге типа Эппендорф по 4.7, [5] при частоте вращения 12000—13000 мин$^{-1}$.

6.2.3 Надосадочную жидкость приготовленных по 6.2.2 смесей переносят в четыре чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см^3, не захватывая частицы суспензии из осадка. Затем в каждую микроцентрифужную пробирку добавляют по 400 мм^3 хлороформа, приготовленного по 6.1.6, перемешивают на аппарате для встряхивания 30 с до образования суспензии. Полученные суспензии центрифугируют 7 мин на настольной микроцентрифуге типа Эппендорф при частоте вращения 12000 мин$^{-1}$ при комнатной температуре.

6.2.4 Верхние слои (водные фазы), приготовленные по 6.2.3, из четырех пробирок переносят в четыре чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см^3, не захватывая слой хлороформа. Экстракцию хлороформом и центрифугирование по 6.2.3 повторяют дважды.

6.2.5 Верхние слои (водные фазы), приготовленные по 6.2.4, переносят в четыре чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 1,5 см^3, добавляют в каждую из них по 600 мм^3 изопропилового спирта по 4.28, [10], предварительно охлажденного в морозильной камере до температуры минус 20 °С, и перемешивают на аппарате для встряхивания 30 с.

Полученные смеси помещают в морозильную камеру температурой минус 20 °С не менее чем на 30 мин для образования осадка дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

На данном этапе допускается хранение полученных смесей до 12 ч в морозильной камере при температуре минус 20 °С.

6.2.6 Смеси, приготовленные по 6.2.5, центрифугируют 6 мин при частоте вращения 12000 мин$^{-1}$ при комнатной температуре. Аккуратно удаляют надосадочную жидкость. Каждый осадок 2—3 раза промывают 200 мм^3 70 %-ного этилового ректификованного спирта, приготовленного по 6.1.7, каждый раз перемешивая осадки на аппарате для встряхивания 15—20 с и центрифугируя их на микроцентрифуге 6 мин при частоте вращения 12000 мин$^{-1}$. Тщательно (до последней капли) удаляют надосадочную жидкость.

6.2.7 Осадки, приготовленные по 6.2.6, растворяют в 50—100 мм^3 деионизированной воды и получают раствор ДНК.

Растворы ДНК, приготовленные по 6.2.7, непосредственно используют для проведения ПЦР или хранят при температуре минус 20 °С сроком до одного года в морозильной камере.

6.3 Приготовление реакционных смесей № 1 и № 2

6.3.1 Приготовление реакционной смеси № 1 на пять проб

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см^3, помещенную в кювету со льдом, вносят 312,5 мм^3 деионизированной воды, 52,5 мм^3 10· буфера для ПЦР с хлоридом магния по 4.38, [17], 26 мм^3 смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9, 13 мм^3 праймера на промотор *35S*-1 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.44, [26], 13 мм^3 праймера на промотор *35S*-2 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.44, [26], 2,5 мм^3 фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм^3) по 4.37, [16], 52,5 мм^3 раствора БСА, приготовленного по 6.1.8. Смесь перемешивают 5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены или пузырьков.

6.3.2 Приготовление реакционной смеси № 2 на пять проб

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см^3, помещенную в кювету со льдом, вносят 312,5 мм^3 деионизированной воды, 52,5 мм^3 10· буфера для ПЦР с хлоридом магния, 26 мм^3 смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9, 13 мм^3 праймера на терминатор *nos*-1 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.45, [27], 13 мм^3 праймера на терминатор *nos*-2 (концентрацией 20 мкмоль/дм^3) по 4.45, [27], 2,5 мм^3 фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм^3), 52,5 мм^3 раствора БСА, приготовленного по 6.1.8. Смесь перемешивают 5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены или пузырьков.

6.3.3 Реакционные смеси № 1 и № 2, приготовленные по 6.3.1 и 6.3.2, центрифугируют на настольной микроцентрифуге 30 с при частоте вращения 3000 мин$^{-1}$. Реакционную смесь № 1 разливают по 90 мм^3 в пять микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см^3 (или 0,5 см^3 в зависимости от типа используемого амплификатора) для проведения ПЦР. Реакционную смесь № 2 разливают по 90 мм^3 в пять других микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см^3 (или 0,5 см^3 в зависимости от типа используемого амплификатора) для проведения ПЦР. Реакционные смеси № 1 и № 2 готовят непосредственно перед проведением ПЦР.

7 Проведение анализа

7.1 В первые две пробирки с реакционной смесью № 1 и в первые две пробирки с реакционной смесью № 2 добавляют автоматическим микродозатором раствор ДНК, выделенной из анализируемого продукта, приготовленный по 6.2.1.1—6.2.1.7, по 2 мм^3 в каждую.

В третью пробирку с реакционной смесью № 1 и в третью пробирку с реакционной смесью № 2 добавляют автоматическим микродозатором раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0), по 2 мм^3 в каждую.

В четвертую пробирку с реакционной смесью № 1 и в четвертую пробирку с реакционной смесью № 2 добавляют автоматическим микродозатором раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), по 2 мм^3 в каждую.

В пятую пробирку с реакционной смесью № 1 и в пятую пробирку с реакционной смесью № 2 автоматическим микродозатором добавляют деионизированную воду по 2 мм^3 в каждую — холостой опыт.

7.2 В каждую пробирку со смесью по 7.1 добавляют, не перемешивая, по одной капле (20—40 мм^3) вазелинового масла по ГОСТ 3164.

7.3 Пробирки со смесями, подготовленными по 7.2, помещают в амплификатор для проведения ПЦР. Программа амплификации для праймеров на промотор *35S* приведена в таблице 1, на терминатор *nos* — в таблице 2.

Таблица 1 — Условия амплификации для *35S* промотора

Стадия	Тип амплификатора				
	Crocodile II	Gene Amp 2400	Progene	Trio	Терцик МС-2
Денатурация	2 мин/98 °С	3 мин/94 °С	3 мин/95 °С	2 мин/96 °С	3 мин/94 °С
Амплификация	8 с/95 °С 30 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С	36 с/95 °С 72 с/54 °С 84 с/72 °С	30 с/95 °С 40 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	40	40	40	40	40
Конечное удлинение	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С
Фаза остывания	1 мин/30 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С
Скорость нагрева	1 °С/с	0,77 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	0,77 °С/с
Скорость остывания	1 °С/с	3,15 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	3,15 °С/с

Таблица 2 — Условия амплификации для терминатора *nos*

Стадия	Тип амплификатора				
	Crocodile II	Gene Amp 2400	Progene	Trio	Терцик МС-2
Денатурация	3 мин/95 °С	3 мин/94 °С	3 мин/95 °С	2 мин/98 °С	3 мин/94 °С
Амплификация	20 с/95 °С 40 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С	36 с/95 °С 72 с/54 °С 84 с/72 °С	30 с/95 °С 40 с/54 °С 40 с/72 °С	20 с/94 °С 40 с/54 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	40	40	40	40	40
Конечное удлинение	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С	3 мин/72 °С
Фаза остывания	1 мин/30 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С	1 мин/4 °С
Скорость нагрева	1 °С/с	0,77 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	0,77 °С/с
Скорость остывания	1 °С/с	3,15 °С/с	1,5 °С/с	1 °С/с	3,15 °С/с

7.4 По окончании ПЦР из каждой микроцентрифужной пробирки осторожно из-под слоя вазелинового масла отбирают по 8 мм^3 смеси и переносят в отдельный карман геля, приготовленного по 6.1.12.

7.5 В отдельный карман геля вносят 8 мм^3 маркера молекулярной массы ДНК по 4.40, [19].

7.6 Гель помещают в камеру прибора по 4.2, [2] для проведения горизонтального электрофореза, заполненную буфером 1· ТБЕ.

Электрофорез проводят при напряженности электрического поля 6 В/см геля в условиях стабилизации напряжения в течение 65 мин.

7.7 Визуализацию продуктов ПЦР после электрофореза осуществляют с помощью видеосистемы по 4.4, [4].

7.8 Результат идентификации в виде файл-паспорта сохраняется на жестком магнитном носителе и может быть выведен на видеомонитор или принтер. Примеры изображений приведены в приложениях А и Б.

8 Обработка результатов анализа

8.1 В пробе со стандартом ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), содержащего промотор *35S*] должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 195 пар

нуклеотидов (п. н.). В пробе со стандартом без ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)] и в холостом опыте не должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 195 пар нуклеотидов (п. н.).

8.2 В пробе со стандартом ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), содержащего терминатор *nos*] должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 180 п. н. В пробе со стандартом без ГМИ [ДНК, выделенная из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения состава (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)] и в холостом опыте не должна присутствовать окрашенная полоса, размер ПЦР-продукта, формирующего эту полосу на гель-электрофореграмме, составляет 180 п. н.

8.3 Интерпретация результатов

8.3.1 Отсутствие в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н. свидетельствует об отсутствии генетически модифицированных источников в анализируемом продукте.

8.3.2 Обнаружение в анализируемой пробе ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н., или одного из них, свидетельствует о наличии генетически модифицированных источников в анализируемом продукте.

8.3.3 В случае обнаружения в одной из параллельно анализируемых проб и отсутствия в другой из параллельно анализируемых проб ПЦР-продуктов необходимо повторить весь анализ с еще одной навеской анализируемого продукта.

8.3.4 Обнаружение в отрицательных контролях ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н. свидетельствует о получении ложноположительного результата. Это возможно при загрязнении ГМИ оборудования и/или реактивов. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и дозаторов раствором соляной кислоты (1 моль/дм^3), заменить реактивы на свежеприготовленные, повторить амплификацию.

8.3.5 Отсутствие в положительном контроле ПЦР-продуктов размером 195 п. н. и 180 п. н. свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. Это возможно в случае потери активности одного из компонентов реакционной смеси для ПЦР. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить амплификацию.

9 Контроль результатов идентификации

Для контроля результатов идентификации используют положительный контроль — раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5), и два отрицательных контроля — холостой опыт и раствор ДНК, выделенной из стандартного образца состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0).

10 Требования безопасности

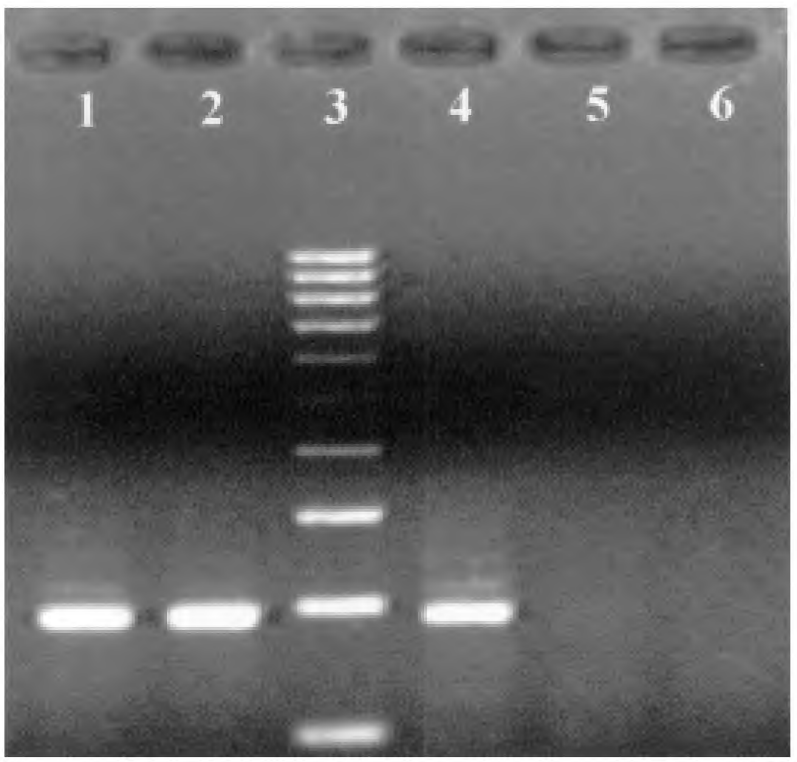
10.1 При выполнении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007. При работе с раствором бромистого этидия и окрашенным гелем необходимо работать в резиновых перчатках

10.2 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.

10.3 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 иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. При работе с УФ-излучением необходимо пользоваться защитным экраном и защитными очками.

Приложение А
(обязательное)

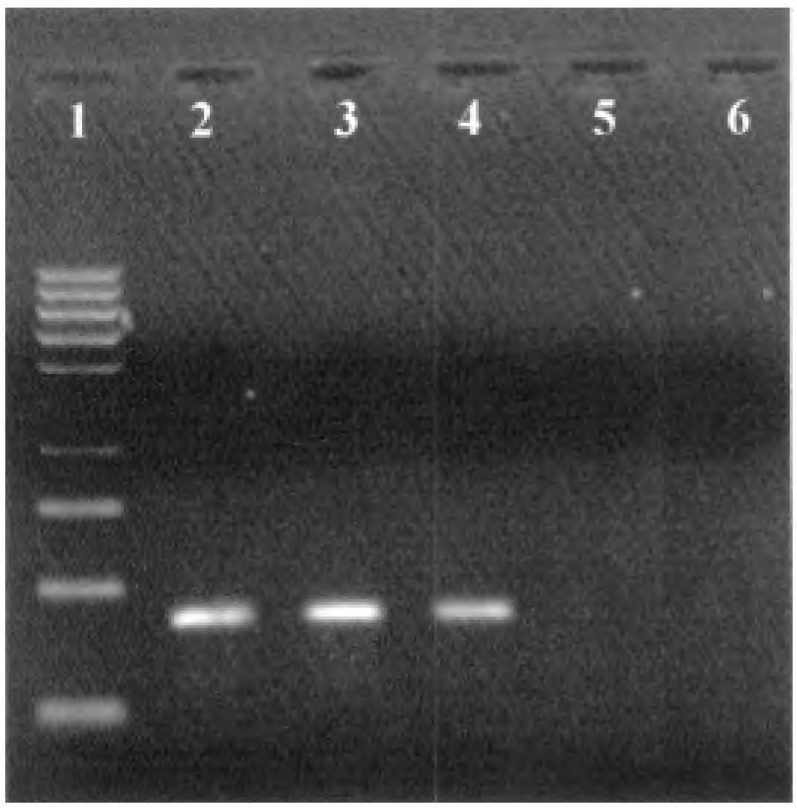
Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (промотор *35S*)



1, *2* — анализируемые пробы; *3* — маркер молекулярной массы 100 п. н.; *4* — стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения; *5* — стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения; *6* — холостой опыт

Приложение Б
(обязательное)

Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (терминатор *nos*)



1 — маркер молекулярной массы 100 п. н.; *2, 3* — анализируемые пробы; *4* — стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения; *5* — стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения; *6* — холостой опыт

Приложение В
(справочное)

Библиография

[1] ТУ 9642-001-4648062—98 — Амплификатор «Терцик МС-2»

[2] «Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170—4406 — Камера для электрофореза «Mini-Sub Cell GT System»

[3] «Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 900—7980 — Источник напряжения «Power Pac 300»

[4] «Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170—86—16 — Видеосистема «Gel Doc 2000™ Gel Documentation System»

[5] ТУ 9452-007-18240041—00 — Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф «ТЭТА», 12000 $мин^{-1}$

[6] ТУ 9452-001-18240041—99 — Термостат «TERMO 24-15»

[7] ТУ 46-22-603—75 — Баня водяная с электрическим или огневым подогревом

[8] ТУ 113-04-146—84 — Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)

[9] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Н 5882 — Гексадецилтриметиламмониум бромид [$C_{19}H_{42}NBr$]

[10] ТУ 6-09-402—85 — Спирт изопропиловый [$CH_3CHOH\ CH_3$]

[11] ОСТ 11.029.003—80 — Вода деионизированная

[12] ТУ 6-09-4292—76 — Трис (оксиметил)аминометан [$NH_2C(CH_2OH)_3$]

[13] ТУ 6-09-08-1024—81 — 2-меркаптоэтанол [C_2H_6OS]

[14] ТУ 6-09-13-452—75 — Этидий бромистый [$C_{21}H_{20}N_3Br$]

[15] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № В 4287 — Альбумин бычий сывороточный сухой

[16] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 1806 — Фермент Taq-полимераза

[17] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Р 2192 — Буфер для ПЦР с $MgCl_2$

[18] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № А 6877 — Агароза для электрофореза

[19] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Р 1473 — ПЦР маркер 100 п. н.

[20] Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 53198 — Стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)

[21] Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 44386 — Стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5)

[22] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 4788 — 2'-дезоксиаденозин-5'трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (АТФ)

[23] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 4913 — 2'-дезоксицитидин-5'трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ)

[24] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 5038 — 2'-дезоксигуанозин-5'трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ГТФ)

[25] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Т 9656 — 2'-дезокситимидин-5'трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ТТФ)

[26] ЗАО «Синтол» Россия (http://www.syntol.ru) — Праймеры на промотор *35S*:
35S-1 5'GCT CCT ACA AAT GCC ATC A 3';
35S-2 5'GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'

[27] ЗАО «Синтол» Россия (gost.e-ecolog.ru) — Праймеры на терминатор NOS:
nos-1 5'GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG 3';
nos-2 5' TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA 3'

УДК 663/664.001.4:006.354

ОКС 65.140, 65.160, 67.060, 67.080, 67.100, 67.120, 67.140, 67.140.30, 67.160.20, 67.180.20, 67.200.20, 67.220, 67.230

Н11, Н13, Н17, Н23, Н27, Н31—Н36, Н41—Н43, Н48, Н51—Н56, Н65, Н68, Н72, Н74, Н81, Н97

С11—С13, С21, С23—С25, С32—С36, С41—С45, С52

ОКСТУ 9109, 9209, 9709

Ключевые слова: пищевое сырье, продукты пищевые, генетически модифицированные источники, идентификация, метод полимеразной цепной реакции, рекомбинантная ДНК, праймер для промотора, праймер для терминатора

Редактор *В. Н. Копысов*
Технический редактор *Л. А. Гусева*
Корректор *Н. И. Гаврищук*
Компьютерная верстка *Т. В. Александровой*

Изд. лиц. № 02354 от 14.07.2000. Сдано в набор 04.03.2004. Подписано в печать 01.04.2004. Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,40.
Тираж 700 экз. С 1686. Зак. 725

ИПК Издательство стандартов,107076 Москва, Колодезный пер., 14.
gost.e-ecolog.ru e-mail: gost.e-ecolog.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов.
248021 Калуга, ул. Московская, 256.
ПЛР № 040138

gost.e-ecolog.ru