

**ИЗМЕНЕНИЯ, УТВЕРЖДЕННЫЕ
К НАЦИОНАЛЬНЫМ СТАНДАРТАМ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

65 СЕЛЬСКОЕ ХОЗЯЙСТВО

**ОКС 65.140, 65.160, 67.060,
67.080, 67.100, 67.120, 67.140, 67.140.30, 67.160, 67.180, 67.190,
67.200, 67.220**

**Группа Н11, Н13, Н17, Н23,
Н31—Н34, Н36, Н41—Н43, Н51—Н56, Н62, Н65, Н68, Н72—Н74,
Н81, Н97, С11, С23—С25, С32—С36, С41—С45, С52**

Изменение № 1 ГОСТ Р 52174—2003 Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

Утверждено и введено в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25.12.2008 № 731-ст

Дата введения 2009—07—01

Разделы 1 (первый абзац), 5. Заменить слова: «пищевое сырье» на «продовольственное сырье»;

дополнить абзацем:

«Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением технологии FLASH изложен в обязательном приложении Д».

Пункт 4.1. Исключить слова: «или «Био-1» [23]».

Пункт 4.2. Исключить слова: «или «Евробио-ВТО» [24]».

Пункт 6.2.1 дополнить абзацем:

«6.2.1 Дополнительно готовят отрицательную контрольную пробу. Для этого в чистую стерильную микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см³ помещают 50 мм³ особо чистой воды по 4.30 и 400 мм³ буфера экстракции по 6.1.8. Дальнейшее приготовление и хранение отрицательной контрольной пробы — в соответствии с требованиями 6.2.2—6.2.6 настоящего стандарта*».

Пункт 8.1. Исключить слова: «или «Био-1» [23]».

Приложение Д изложить в новой редакции:

* Отрицательную контрольную пробу по 6.2.1 подготавливают только при применении технологии FLASH (приложение Д).

(Продолжение см. с. 34)

«Приложение Д
(обязательное)

**Метод идентификации генетически модифицированных источников
(ГМИ) растительного происхождения с применением технологии
FLASH**

Д.1 Сущность метода

Метод основан на технологии FLASH, то есть проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфической гибридизацией флуоресцентномеченых зондов в процессе амплификации и последующей детекции продуктов амплификации при помощи ПЦР-детектора «Джин». Чувствительность метода — не менее 100 копий ДНК на реакционный объем.

Д.2 Определения

Д.2.1 ПЦР-детектор «Джин»: Специализированный флуориметр, предназначенный для регистрации результатов ПЦР при использовании комплектов реагентов, основанных на принципах флуоресцентной детекции.

Д.3 Аппаратура, материалы и реактивы — в соответствии с разделом 4 настоящего стандарта со следующими дополнениями:

Д.3.1 Компьютерная программа «Gene» для учета и интерпретации результатов, полученных при помощи ПЦР-детектора «Джин» [23].

Д.3.2 ПЦР-детектор «Джин» [24] или ПЦР-детектор «Джин-4» [25].

Д.3.3 Четыре комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК в микроцентрифужных пробирках для амплификации — «СКАН-35S», «СКАН-gus», «СКАН-pos» и «СКАН-prt» [26], каждый из которых включает:

- 50 микроцентрифужных пробирок для амплификации, запечатанных парафином, содержащих по 20 мм³ смеси, включающей ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентномеченные зонды, внутренний контрольный образец ДНК;

- 500 мм³ раствора Таq-полимеразы — одна микроцентрифужная пробирка;

- 200 мм³ буферного раствора «ПЦР-буфер» — одна микроцентрифужная пробирка;

- 1,0 см³ минерального масла — одна микроцентрифужная пробирка;

- положительная контрольная пробы ДНК, 150 мм³ — одна микроцентрифужная пробирка.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими

ми характеристиками не хуже указанных в приложении Д и разделе 4 настоящего стандарта.

Д.4 Отбор проб

Отбор проб — в соответствии с требованиями раздела 5 настоящего стандарта.

Д.5 Подготовка к проведению анализа

Д.5.1 Приготовление растворов

Приготовление растворов осуществляется в соответствии с 6.1 настоящего стандарта.

Д.5.2 Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК)

Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК) — в соответствии с требованиями 6.2 настоящего стандарта

Д.6 Проведение анализа

Д.6.1 Растворы ДНК, подготовленные в соответствии с Д.5 и 6.2, анализируют при помощи комплектов для амплификации ДНК: «СКАН-35S», «СКАН-gus», «СКАН-nos» и «СКАН-prt» по Д.3.3.

Д.6.2 Маркируют микроцентрифужные пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации по Д.3.3 в количестве, соответствующем количеству анализируемых растворов ДНК. Дополнительно маркируют:

- две микроцентрифужные пробирки для ПЦР-амплификации ДНК маркируют как «К+» (положительный контроль);
- две микроцентрифужные пробирки для ПЦР-амплификации ДНК маркируют как «К-» (отрицательный контроль);
- две микроцентрифужные пробирки для ПЦР-амплификации ДНК маркируют как «ФОН».

Д.6.3 В промаркованные микроцентрифужные пробирки по Д.6.2, за исключением пробирок, промаркованных как «ФОН», не повреждая слой парафина, микродозатором по 4.12 настоящего стандарта вносят по 10 мм³ раствора Таq-полимеразы по Д.3.3, тщательно перемешанного на аппарате для встряхивания по 4.10 настоящего стандарта. В микроцентрифужные пробирки, промаркованные как «ФОН» по Д.6.2, микродозатором вносят по 10 мм³ ПЦР-буфера по Д.3.3.

Д.6.4 Во все микроцентрифужные пробирки по Д.6.3 микродозатором вносят по 20 мм³ минерального масла по Д.3.3, плотно закрывают пробирки крышками.

Д.6.5 В микроцентрифужные пробирки по Д.6.4, за исключением пробирок, промаркованных как «ФОН», «К-» и «К+», не повреждая слой парафина, микродозатором вносят по 5,0 мм³ анализируемого раствора ДНК по 6.2 настоящего стандарта.

(Продолжение см. с. 36)

Д.6.6 В микроцентрифужные пробирки, промаркованные как «ФОН» и «К-» по Д.6.4, не повреждая слой парафина, микродозатором вносят по 5,0 мм³ отрицательной контрольной пробы по 6.2 настоящего стандарта.

Д.6.7 В микроцентрифужные пробирки по Д.6.4, промаркованные как «К+», не повреждая слой парафина, микродозатором вносят по 5,0 мм³ положительной контрольной пробы из состава соответствующего комплекта реагентов для амплификации ДНК по Д.3.3.

Д.6.8 Все микроцентрифужные пробирки, подготовленные по Д.6.5 — Д.6.7, плотно закрывают крышками и центрифицируют на настольной микроцентрифуге по 4.8 настоящего стандарта при частоте вращения 1000 мин⁻¹ в течение 5—10 с и сразу же используют для проведения анализа.

Д.6.9 Все микроцентрифужные пробирки по Д.6.8 помещают в амплификатор ДНК по 4.3 настоящего стандарта и проводят ПЦР по программе, указанной в таблице Д.1. При запуске программы указывают объем реакционной смеси, равный 35 мм³.

Таблица Д.1 — Программа проведения ПЦР

Шаг программы	Температура	Время инкубации	Число циклов
1	94 °C	1 мин	1
2	94 °C	5 с	5
	67 °C	15 с	
3	94 °C	1 с	40
	67 °C	15 с	
4	10 °C	Режим хранения	

Д.6.10 Все определения должен проводить квалифицированный, специально обученный персонал в соответствии с требованиями [22]. При проведении анализа 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 по 4.14 настоящего стандарта.

Д.7 Обработка результатов анализа

Д.7.1 После прохождения реакции амплификации все микроцентри-

(Продолжение см. с. 37)

(Продолжение Изменения № 1 к ГОСТ Р 52174—2003)

фужные пробирки по Д.6.9 помещают в ПЦР-детектор «Джин» по Д.3.2 для проведения регистрации результатов ПЦР. В соответствии с руководством по эксплуатации к ПЦР-детектору «Джин» проводят регистрацию результатов ПЦР (пороговые значения для продукта амплификации и для внутреннего контрольного образца указаны в инструкции к комплектам реагентов для амплификации ДНК).

Д.7.2 Учет и интерпретация результатов

Д.7.2.1 Учет и интерпретация результатов анализа осуществляется автоматически при помощи компьютерной программы «Gene» [23]. Результаты анализа отображаются на экране компьютера в виде таблицы (рисунок Д.1).

Д.7.2.2 За положительный результат принимают отображение символа «+» на красном фоне напротив обозначения анализируемой пробы в графе «Результат» таблицы. Положительный результат фиксируется в микроцентрифужных пробирках комплектов реагентов «СКАН-35S», «СКАН-nos», «СКАН-gus», «СКАН-prt» для анализируемых проб, содержащих нуклеотидные последовательности, характерные для промотора 35S, промотора nos, гена gus, гена prtII, соответственно.

Д.7.2.3 За отрицательный результат принимают отображение символа «—» на зеленом фоне напротив обозначения анализируемой пробы в графе «Результат» таблицы. Отрицательный результат фиксируется в микроцентрифужных пробирках комплектов реагентов «СКАН-35S», «СКАН-nos», «СКАН-gus», «СКАН-prt» для проб, не содержащих нуклеотидные последовательности, характерные для промотора 35S, промотора nos, гена gus, гена prtII, соответственно.

Пример оформления протокола испытания — в соответствии с приложением Г настоящего стандарта.

Д.7.2.4 За недостоверный результат принимают отображение символа «нд» на оранжевом фоне или символа «?» на желтом фоне (на рисунке Д.1 желтый фон отсутствует) напротив обозначения анализируемой пробы в графе «Результат» таблицы.

Это может быть вызвано несоблюдением условий анализа или несоблюдением условий выделения ДНК. В случае получения недостоверного результата определение повторяют.

Д.7.2.5 В случае отображения символа «+» на красном фоне напротив обозначения отрицательной контрольной пробы в графе «Результат» таблицы, результаты анализа считают ложноположительными.

Причиной может быть загрязнение ГМИ реактивов и/или оборудования. В этом случае определение повторяют с заменой реактивов на свежеприготовленные.

(Продолжение см. с. 38)

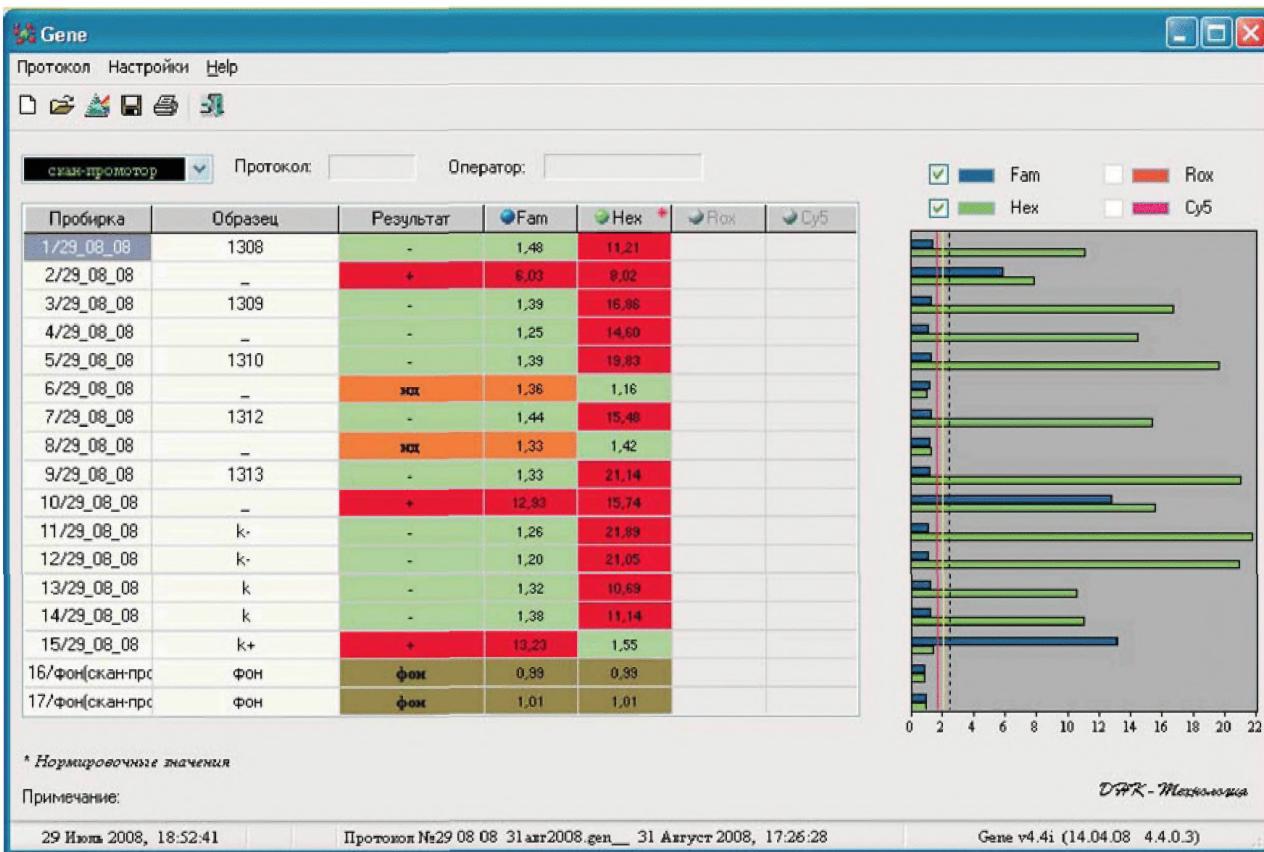


Рисунок Д.1 — Пример результатов анализа

Д.8 Требования безопасности

При проведении всех работ необходимо соблюдать требования техники безопасности в соответствии с разделом 9 настоящего стандарта».

Стандарт дополнить приложением — Е:

«Приложение Е (справочное)

Библиография

- | | |
|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [1] Центр биологических микрочипов ИМБ РАН | Компьютерная программа «Imageware» для анализа изображений, полученных при помощи «Чипдетектора-03» |
| [2] ТУ 9443-001-02699501—2003 | Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов «Чипдетектор-03» |
| [3] ТУ 9452-001-4648062—98 | Амплификатор «Терцик МС-2» |
| [4] ТУ 42-619-61 | Термостат суховоздушный ТВР-25 |
| [5] Корпорация «Эппендорф», кат. № 5425 000.014 | Микроцентрифуга настольная 5415C, 13000 мин ⁻¹ |
| [6] Корпорация «Хеликон», кат. № MSH-300 | Мешалка магнитная с подогревом |
| [7] Корпорация «Хеликон», кат. № FV-2400 | Аппарат для встраивания (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 | Этилендиаминетрауксусной кислоты натриевая соль дигидрат |
| [11] ТУ 6-09-4292-76 | Трис(оксиметил)аминометан [NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃] |
| [12] Корпорация «Сигма («Sigma»), кат. № L-6026 | Додецилсульфат натрия (SDS) |
| [13] Корпорация «Сигма («Sigma»), кат. № Д 1806 | Фермент Таq-полимераза 5 Ед.акт./мм ³ |

(Продолжение см. с. 40)

(Продолжение Изменения № 1 к ГОСТ Р 52174—2003)

[14] Корпорация «Хеликон», кат. № Am-038-0.5	Гуанидин тиоцианат [$\text{CH}_3\text{N}_3^- \text{HSCN}$]
[15] Корпорация «Хеликон», кат. № Am-0485-01	N-[2-оксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{J}_4\text{SNa}$]
[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 Сан-эпиднадзора Российской Федерации; № 06-19/52-17 от 15.06.95
[23] ООО «НПО ДНК-Технология»	Компьютерная программа «Gene» для учета и интерпретации результатов, полученных при помощи ПЦР-детектора «Джин»
[24] ТУ 9443-005-46482062—2003	ПЦР-детектор «Джин»
[25] ТУ 9443-001-96301278—2007	ПЦР-детектор «Джин-4»
[26] ООО «БИОМАСТЕР-ПРОМ»	Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации ДНК «СКАН-35S», «СКАН-gus», «СКАН-nos» и «СКАН-npt»

(ИУС № 4 2009 г.)