ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ГОСТ Р 52173-2005

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

СЫРАВІНА І ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Метад ідэнтыфікацыі генетычна мадыфікаваных крыніц (ГМК) раслінага паходжання

(ГОСТ Р 52173-2003, IDT)

Издание официальное

БЗ 6-2005

Госстандарт
Минск

УДК 663/664.001.4:006.354 МКС 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 КП 03

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

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации»

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН отделом стандартизации Госстандарта Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 24 июня 2005 г. № 28

3 Настоящий стандарт идентичен государственному стандарту Российской Федерации ГОСТ Р 52173-2003 «Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения».

Государственный стандарт Российской Федерации разработан ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность», Государственным учреждением научно-исследовательским институтом питания РАМН (ГУ НИИ питания РАМН), центром «Биоинженерия» РАН.

Официальные экземпляры государственных стандартов Российской Федерации, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт и на который дана ссылка, имеются в БелГИСС.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

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 3
7 Проведение анализа 6
8 Обработка результатов анализа 7
9 Контроль результатов идентификации 8
10 Требования безопасности 8
Приложение А (обязательное) Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (промотор *35S*) 9
Приложение Б (обязательное) Пример фотографии результата электрофореза для идентификации генетически модифицированных источников: рекомбинантная ДНК (терминатор *nos)* 10
Приложение В (справочное) Библиография 11

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

СЫРАВІНА І ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Метад ідентыфікацыі генетычна мадыфікаваных крыніц (ГМК) расліннага паходжання

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

Дата введения 2006-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые сырье и продукты (далее – продукты) 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 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3164-78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 4233-77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9656-75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Технические условия

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

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

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

Издание официальное

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 генноинженерный 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 $^{o}C/с$ [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 люминесцирующих 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^{-1}.

4.10 Печь микроволновая (мощностью не менее 400 Вт).

4.11 Весы лабораторные 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 $мм^3$, (шаг 0,01 $мм^3$, точность ± 1,2 %);

0,5 – 10,0 $мм^3$, (шаг 0,01 $мм^3$, точность ± 0,8 %);

2 – 20 $мм^3$, (шаг 0,01 $мм^3$, точность ± 0,8 %);

20 – 200 $мм^3$, (шаг 0,1 $мм^3$, точность ± 0,6 %);

100 – 1000 $мм^3$, (шаг 1 $мм^3$, точность ± 3 %);

2 – 10 $см^3$, (шаг 0,1 $см^3$, точность ± 0,5 %).

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

4.16 Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10; 20; 200; 1000 $мм^3$; 10 $см^3$.

4.17 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 25; 50; 100; 200; 1000 $см^3$ по ГОСТ 12738.

4.18 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные на 25; 100; 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770.

4.19 Пестик тефлоновый или стеклянная палочка по ГОСТ 21400 под размер микроцентрифужной пробирки вместимостью 1,5 $см^3$.

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 3';
35S-2 5' GAT AGT GGG ATT GTG GGT 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 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/дм^3

В колбу мерную по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см^3 помещают 12,11 г Трис (оксиметил) аминометана по 4.33 [12], растворяют в 80 см^3 деионизированной воды по 4.32 [11]. Кислотой соляной концентрированной 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* (NC1) = 5 моль/дм^3

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 29,22 г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в 80 см^3 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 *с* (NaOH) = 30 %

В колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 50 $см^3$ помещают 3 г гидроокиси натрия по ГОСТ 4328, растворяют в 7 $см^3$ деионизированной воды.

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

6.1.4 Приготовление раствора концентрацией *с* (ЭДТА) = 0,5 моль/$дм^3$

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ помещают 14,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты по 4.23 [8], растворяют в 80 $см^3$ 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 колбу мерную по ГОСТ 1770 вместимостью 25 $см^3$ помещают 0,5 г бромида гексадецилтриметиламмония, растворяют в 10 $см^3$ деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 2,5 $см^3$ раствора Трис-HCl, приготовленного по 6.1.1, 7 $см^3$ раствора хлористого натрия, приготовленного по 6.1.2, 1 $см^3$ 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 $мм^3$ на 1 $см^3$ лизирующего буфера и перемешивают.

6.1.6 Приготовление хлороформа, насыщенного водой

В колбу вместимостью 200 $см^3$ вносят цилиндром по ГОСТ 1770 100 $см^3$ хлороформа по ГОСТ 20015, добавляют 20 $см^3$ воды деионизированной 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 $см^3$ вносят цилиндром 70 $см^3$ 96 %-ного спирта этилового ректификованного по ГОСТ Р 51652, добавляют 26 $см^3$ деионизированной воды и перемешивают.

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

6.1.8 Приготовление раствора концентрацией *с* (БСА) = 20 мкг/$см^3$

В пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 $см^3$ помещают 0,002 г сухого БСА по 4.36 [15], добавляют 1 $см^3$ деионизированной воды, перемешивают до полного растворения. Отбирают 10 $мм^3$ приготовленного раствора и переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 $см^3$, добавляют 1 $см^3$ 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 *с* = 4 ммоль/$дм^3$

В микроцентрифужную пробирку вместимостью 0,2 $см^3$ вносят 96 $мм^3$ деионизированной воды, 1 $мм^3$ АТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43, [22], 1$мм^3$ ГТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43, [24], 1 $мм^3$ ЦТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43 [23], 1 $мм^3$ ТТФ (концентрацией 100 ммоль/$дм^3$) по 4.43 [25], смесь перемешивают.

Срок хранения при температуре минус 20 °С – не более 12 мес.

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 кислоты борной 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 *с* ($C_{21}H_{20}N_3Br$) = 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 немодифицированного 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 – 6.2.7, 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 немодифицированного 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				
	Crokodile 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 немодифицированного 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 немодифицированного 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 немодифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0).

10 Требования безопасности

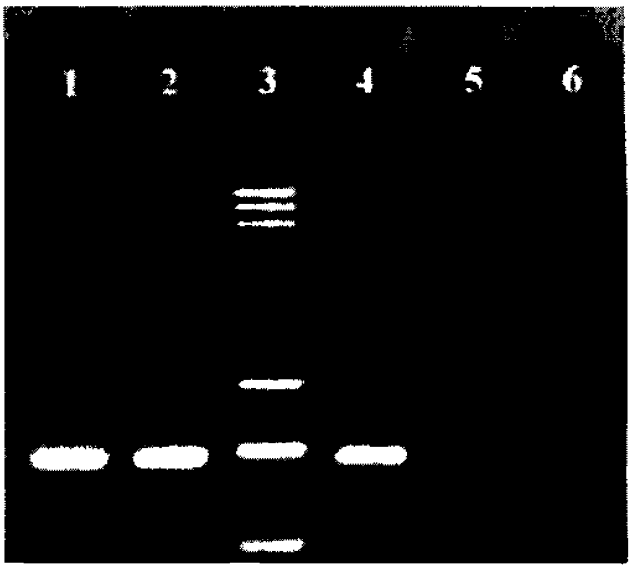
10.1 При выполнении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007. При работе с раствором бромистого этидия и окрашенным гелем необходимо работать в резиновых перчатках

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 немодифицированного 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 немодифицированного 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 Sustem»

[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 $MgC1_2$

[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 немодифицированного источника пищи растительного происхождения

[21] Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 44386 — Стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0).

[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 3';
35S-2′ 5′ GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA 3'

[27] ЗАО «Синтол» Россия (http://www.syntol.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'

Ответственный за выпуск *В.Л. Гуревич*

Сдано в набор 16.01.2007. Подписано в печать 13.02.2007. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,86 Уч.- изд. л. 0,84 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение
НП РУП «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
Лицензия № 02330/0133084 от 30.04.2004.
220113, г. Минск, ул. Мележа, 3.