

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (гми) растительного происхождения

Издание официальное

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 <i>nos</i>)	10
Приложение В Библиография	11

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 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 9656—75 Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

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 ректифицированный 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 «Тердик МС-2» под микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 см³ 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 «ТЕРМО 24-15» под микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 см³, 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 рН-метр с набором электродов, с погрешностью ±0,1 рН.

4.14 Дозаторы с переменным объемом дозирования:

0,2—2,0 мм³, шагом 0,01 мм³, 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 Гексадецилтриметиламмоний бромид [9].

4.25 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

4.26 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

4.27 Спирт этиловый ректифицированный 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 Таq-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'-дезокситидин-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-НСI)=1 моль/дм³

В мерную колбу по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см³ помещают 12,11 г Трис (оксиметил) аминметана по 4.33, [12] растворяют в приблизительно 80 см³ деионизированной воды по 4.32, [11]. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят рН 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 рН 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 бромид гексадецилтриметиламмония, растворяют в 10 см³ деионизированной воды, добавляют автоматическим микродозатором 2,5 см³ раствора Трис-НСI, 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 ректифицированного спирта

В колбу вместимостью 200 см³ вносят цилиндром 70 см³ 96 %-ного этилового ректифицированного 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 см³ 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/см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ 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 см³ помещают 1 г агарозы по 4.39, [18], добавляют 50 см³ 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 мм³ 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 см³. С помощью дозатора добавляют в каждую по 200 мм³ лизирующего буфера с меркаптоэтанолом по 6.1.5 и немедленно тefлоновым пестиком растирают смесь до получения однородной массы. В каждую микроцентрифужную пробирку добавляют по 600 мм³ лизирующего буфера с меркаптоэтанолом. Смесь тщательно перемешивают тefлоновым 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 см³, не захватывая частицы суспензии из осадка. Затем в каждую микроцентрифужную пробирку добавляют по 400 мм³ 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 см³, 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 см³, добавляют в каждую из них по 600 мм³ 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 мм³ 70 %-ного этилового ректифицированного 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 мм³ 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 см³, помещенную в кювету со льдом, вносят 312,5 мм³ деионизированной воды, 52,5 мм³ 10-буфера для ПЦР с хлоридом магния по 4.38, [17], 26 мм³ смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9, 13 мм³ праймера на промотор 35S-1 (концентрацией 20 мкмоль/дм³) по 4.44, [26], 13 мм³ праймера на промотор 35S-2 (концентрацией 20 мкмоль/дм³) по 4.44, [26], 2,5 мм³ фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм³) по 4.37, [16], 52,5 мм³ 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 см³, помещенную в кювету со льдом, вносят 312,5 мм³ деионизированной воды, 52,5 мм³ 10-буфера для ПЦР с хлоридом магния, 26 мм³ смеси нуклеотидов, приготовленной по 6.1.9, 13 мм³ праймера на терминатор *nos-1* (концентрацией 20 мкмоль/дм³) по 4.45, [27], 13 мм³ праймера на терминатор *nos-2* (концентрацией 20 мкмоль/дм³) по 4.45, [27], 2,5 мм³ фермента Taq-полимеразы (концентрацией 5 ед/мм³), 52,5 мм³ 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 мм³ в пять микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см³ (или 0,5 см³ в зависимости от типа используемого амплификатора) для проведения ПЦР. Реакционную смесь № 2 разливают по 90 мм³ в пять других микроцентрифужных пробирок вместимостью 0,2 см³ (или 0,5 см³ 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 мм³ 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 мм³ 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 мм³ в каждую.

В пятую пробирку с реакционной смесью № 1 и в пятую пробирку с реакционной смесью № 2 автоматическим микродозатором добавляют деионизированную воду по 2 мм³ в каждую — холостой опыт.

7.2 В каждую пробирку со смесью по 7.1 добавляют, не перемешивая, по одной капле (20—40 мм³) 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.

Т а б л и ц а 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	20 с/94 °С	36 с/95 °С	30 с/95 °С	20 с/94 °С
	30 с/54 °С	40 с/54 °С	72 с/54 °С	40 с/54 °С	40 с/54 °С
	40 с/72 °С	60 с/72 °С	84 с/72 °С	40 с/72 °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

Т а б л и ц а 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	20 с/94 °С	36 с/95 °С	30 с/95 °С	20 с/94 °С
	40 с/54 °С	40 с/54 °С	72 с/54 °С	40 с/54 °С	40 с/54 °С
	40 с/72 °С	60 с/72 °С	84 с/72 °С	40 с/72 °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 мм³ смеси и переносят в отдельный карман геля, приготовленного по 6.1.12.

7.5 В отдельный карман геля вносят 8 мм³ 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/дм³), 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.

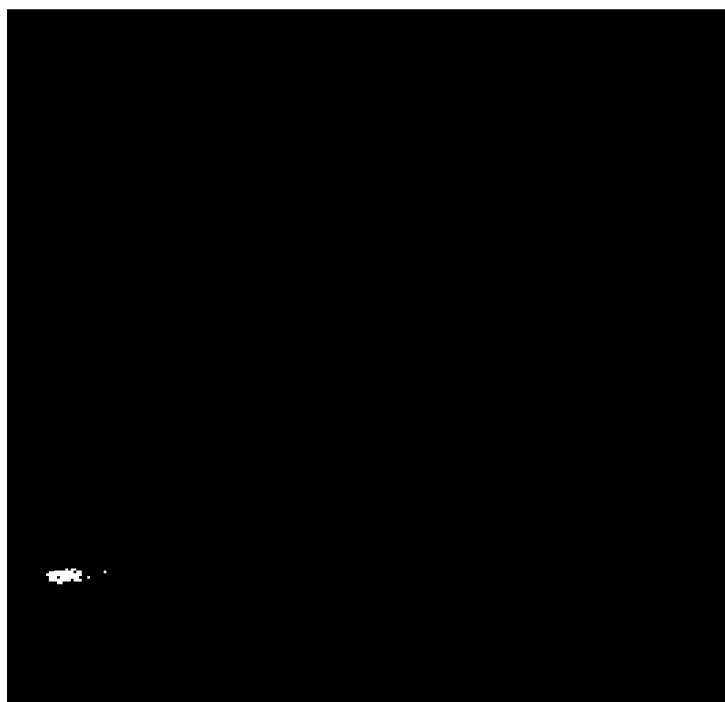
10.2 Помещение, в котором проводятся работы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

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)

195 п. н.



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*)

180 п. н.



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
 [2] «Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170—4406
 [3] «Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 900—7980
 [4] «Био-Рад Лаборатория», «Bio-Rad Laboratories» (США), кат. № 170—86—16
 [5] ТУ 9452-007-18240041—00
 [6] ТУ 9452-001-18240041—99
 [7] ТУ 46-22-603—75
 [8] ТУ 113-04-146—84
 [9] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Н 5882
 [10] ТУ 6-09-402—85
 [11] ОСТ 11.029.003—80
 [12] ТУ 6-09-4292—76
 [13] ТУ 6-09-08-1024—81
 [14] ТУ 6-09-13-452—75
 [15] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № В 4287
 [16] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 1806
 [17] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Р 2192
 [18] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № А 6877
 [19] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Р 1473
 [20] Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 53198
 [21] Корпорация «Сигма Алдрич» («Fluka»), кат. № 44386
 [22] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 4788
 [23] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 4913
 [24] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 5038
 [25] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Т 9656
 [26] ЗАО «Синтол» Россия (<http://www.syntol.ru>)
 [27] ЗАО «Синтол» Россия (<http://www.syntol.ru>)
- Амплификатор «Терцик МС-2»
 Камера для электрофореза «Mini-Sub Cell GT System»
 Источник напряжения «Power Pac 300»
 Видеосистема «Gel Doc 2000™ Gel Documentation System»
 Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф «ТЭТА», 12000 мин⁻¹
 Термостат «ТЕРМО 24-15»
 Баня водяная с электрическим или огневым подогревом
 Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)
 Гексадецилтриметиламмоний бромид [C₁₉H₄₂NBr]
- Спирт изопропиловый [CH₃CHOH CH₃]
 Вода деионизированная
 Трис (оксиметил)аминометан [NH₂C(CH₂OH)₃]
 2-меркаптоэтанол [C₂H₆OS]
 Этидий бромистый [C₂₁H₂₀N₃Br]
 Альбумин бычий сывороточный сухой
- Фермент Таq-полимераза
 Буфер для ПЦР с MgCl₂
 Агароза для электрофореза
 ПЦР маркер 100 п. н.
- Стандартный образец состава генетически не модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-0)
 Стандартный образец состава генетически модифицированного источника пищи растительного происхождения (Certified Reference Material IRMM № 410R SB-5)
 2'-дезоксаденозин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (АТФ)
 2'-дезокситидин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ЦТФ)
 2'-дезоксигуанозин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ГТФ)
 2'-дезокситимидин-5'-трифосфорной кислоты тетранатриевая соль, тригидрат (ТТФ)
 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'
 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	H11	C11—C13	ОКСТУ 9109
	65.160	H13	C21	9209
	67.060	H17	C23—C25	9709
	67.080	H23	C32—C36	
	67.100	H27	C41—C45	
	67.120	H31—H36	C52	
	67.140	H41—H43		
	67.140.30	H48		
	67.160.20	H51—H56		
	67.180.20	H65		
	67.200.20	H68		
	67.220	H72		
	67.230	H74		
		H81		
		H97		

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.
<http://www.standards.ru> e-mail: info@standards.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов.
248021 Калуга, ул. Московская, 256.
ПЛИР № 040138