

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

Изменение № 2 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 22.11.2013 № 1896-ст

Дата введения — 2014—07—01

Раздел 1. Второй абзац. Заменить слова: «пяти» на «десяти», « 10^{-12} г (1 пг)» на « 10^{-9} г (1 нг, $\sim 10^3$ геном-эквивалентов тотальной растительной ДНК/1 мкл пробы)».

Раздел 2 дополнить ссылкой:

«ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия».

Пункты 4.1, 4.2 изложить в новой редакции:

«4.1 Универсальный аппаратно-программный комплекс (УАПК) для анализа биологических микрочипов с компьютерной программой для анализа полученных результатов [1].

4.2 Хлороформ по ГОСТ 20015, х.ч.».

Пункт 4.3. Заменить ссылку: [3] на [2].

Пункт 4.4. Заменить ссылку: [4] на [3].

Пункт 4.8. Заменить ссылку: [5] на [4].

Пункт 4.9. Заменить ссылку: [6] на [5].

Пункт 4.10. Заменить ссылку: [7] на [6].

Пункт 4.13. Заменить ссылку: [8] на [7].

Пункт 4.14. Заменить ссылку: [9] на [8].

Пункт 4.24. Заменить ссылку: [10] на [9].

Пункт 4.25. Заменить ссылку: [11] на [10].

Пункт 4.28 изложить в новой редакции:

«4.28 Цетилтриметиламмоний бромид [11]».

Пункт 4.31 изложить в новой редакции:

«4.31 Фермент термостабильный HotTaq-полимераза для ПЦР с «горячим стартом», оптимум активности при температуре 70 °С — 72 °С [12]».

Пункты 4.33—4.36 изложить в новой редакции:

«4.33 Буфер гибридизационный [13].

4.34 Баня водяная [18].

4.35 Раствор водный дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дГТФ, дУТФ, дЦТФ с молярной концентрацией по 2 мМ каждого [14].

4.36 Раствор флуоресцентного субстрата ФС [15]».

Пункт 4.37. Заменить ссылку: [17] на [16].

Пункт 4.38. Заменить ссылку: [18] на [17].

Пункты 4.39—4.41 изложить в новой редакции:

«4.39 Раствор водный праймеров «ПР-1» для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров [19]:

- праймеры для амплификации фрагмента гена *RBCL*, кодирующего большую субъединицу рибулозы-1,5-бисфосфат карбоксилазы/оксигеназы (Асс. № Z95552, поз. 160—720);

- праймеры для амплификации фрагмента гена лектина *LE1* (Асс. № K00821M30884, поз. 1080—1720);

- праймеры для амплификации фрагмента гена *IVR1*, кодирующего бета-фруктозидазу (Асс. № U16123, поз. 300—1090);

- праймеры для амплификации фрагмента 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (Асс. № FM 177585, поз. 3560—3870);

- праймеры для амплификации фрагмента 35S-терминатора вируса мозаики цветной капусты (Асс. № FM177585, поз. 1260—1590);

- праймеры для амплификации фрагмента 35S-промотора каулимовируса мозаики норичника (*FMV*, Асс. № Х06166, поз. 6260—6630);

- праймеры для амплификации фрагмента терминатора гена белка теплового шока пшеницы (Асс. № Х58279, поз. 10—210);

- праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена *BAR*, определяющего устойчивость к фосфинотрицину (Асс. № АУ310901, поз. 380—920);

- праймеры для амплификации фрагмента терминатора *nos* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*: (Асс. № FM177585, поз. 10—370).

4.40 Раствор водный праймеров «ПР-2» для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров [20]:

- праймеры для амплификации фрагмента гена фосфорилазы УДФ-глюкозы (*UDP-GP*) (Асс. № D00667, поз. 50—310);

- праймеры для амплификации фрагмента гена фосфат-синтазы риса (*SPS*) (Асс. № U33175, поз. 5910—6250);

- праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена *nptII* из транспозона *Tn5* бактериального происхождения (Асс. № EU886197, поз. 9792—10145);

- праймеры для амплификации фрагмента терминатора *ocs* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* (Асс. № AJ311872, поз. 5050—5240);

- праймеры для амплификации фрагмента терминатора гена *RBCS* гороха (Асс. № FM177582.1, поз. 5782—5920);

- праймеры для амплификации фрагмента промотора гена актина риса *ACT1* (Асс. № S44221, поз. 12—380);

- праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена *gus* из бактерии *Escherichia coli* (Асс. № EU503042, поз. 2770—3140).

4.41 Биологический микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами, назначение которых приведено в таблице 1 (название олигонуклеотида соответствует изображенному на рисунке 1) [21]:

Т а б л и ц а 1 — Обозначение и назначение олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Назначение олигонуклеотида
<i>piDNA (rbcl)</i>	ген <i>RBCL</i>	Зонд для идентификации ДНК растительного происхождения в анализируемом материале
<i>GM/ST1(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК сои и/или картофеля
<i>ZM1(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК кукурузы
<i>OS1(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК риса
<i>ST1₂(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК картофеля
<i>GM2(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК сои
<i>ZM/OS2(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК кукурузы и/или риса
<i>ST2(RBCL)</i>	ген <i>RBCL</i>	Видоспецифичный зонд для идентификации ДНК картофеля
<i>Le1(Gm)</i>	ген лектина (<i>LE1</i>)	Специфичный зонд для идентификации ДНК сои
<i>Zein(Zm)</i>	ген <i>IVR1</i>	Специфичный зонд для идентификации ДНК кукурузы

Окончание таблицы 1

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Назначение олигонуклеотида
<i>UDP-GP (St)</i>	ген фосфорилазы УДФ-глюкозы	Специфичный зонд для идентификации ДНК картофеля
<i>SPS (Os)</i>	ген фосфат-синтазы риса	Специфичный зонд для идентификации ДНК риса
<i>nptII</i>	ген <i>npt</i>	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена <i>nptII</i> из транспозона <i>Tn5</i>
<i>35S_p CAMV</i>	промотор 35S	Специфичный зонд для идентификации 35S промотора вируса мозаики цветной капусты
<i>35S_p FMV</i>	промотор <i>FMV</i>	Специфичный зонд для идентификации 35S <i>FMV</i> промотора каулимовируса мозаики норичника
<i>Act1_p</i>	ген актина <i>ACT1</i>	Специфичный зонд для идентификации промотора гена актина риса
<i>Gus</i>	ген <i>gus</i>	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена <i>gus</i>
<i>nos_t</i>	терминатор <i>nos</i>	Специфичный зонд для идентификации терминатора <i>nos</i> из агробактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>35S_t CAMV</i>	терминатор 35S	Специфичный зонд для идентификации 35S терминатора вируса мозаики цветной капусты
<i>rbcSt</i>	Терминатор гена <i>RBCS</i>	Специфичный зонд для идентификации терминатора гена <i>RBCS</i> гороха
<i>Ocs_t</i>	Терминатор <i>Ocs</i>	Специфичный зонд для идентификации терминатора <i>ocs</i> из агробактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>Bar</i>	ген <i>BAR</i>	Специфичный зонд для идентификации маркерного гена <i>BAR</i>

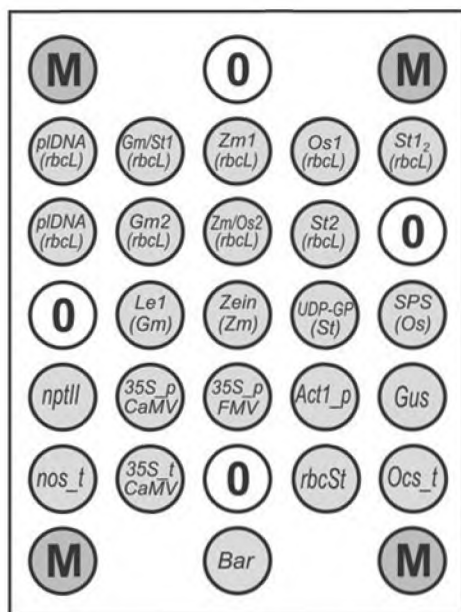


Рисунок 1 — Схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения

Обозначение ячеек приведено в соответствии с назначением иммобилизованного в ней зонда, указанного в таблице 1.

Биологический микрочип представляет собой пластиковую подложку, выполненную в формате предметного стекла по ГОСТ 9284, на поверхности которой в определенном порядке расположена 31 ячейка полиакриламидного геля в форме полусферы диаметром 100 мкм (обозначены кружками на рисунке 1). 22 из них содержат индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (перечень и назначение олигонуклеотидов приведены в таблице 1). Пять ячеек с индексом «0» не содержат перечисленных индивидуальных ковалентно иммобилизованных олигонуклеотидов и выполняют роль отрицательного контроля гибридизации. Четыре ячейки с индексом «М», содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для автоматического вычисления интенсивности флуоресценции ячеек биологического микрочипа после гибридизации. Поверхность биологического микрочипа должна быть закрыта специальной составной крышкой с отверстиями, которая вместе с подложкой образует гибридизационную камеру, предназначенную для проведения реакции гибридизации анализируемых ПЦР-продуктов с иммобилизованными на биологическом микрочипе олигонуклеотидами, и исключающую возможность испарения реакционной смеси в процессе гибридизации. Диагностическая специфичность при идентификации растительной ДНК сои, картофеля, кукурузы, риса составляет не менее 95 %.

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

Пункт 6.1.2. Заменить слова: «186,12 г/дм³» на «74,4 г/дм³», «18,61 г» на «7,44 г», «гидроокиси натрия» на «NaOH».

Пункты 6.1.4—6.1.9 изложить в новой редакции:

«6.1.4 Приготовление раствора Трис-HCl массовой концентрации 242,2 г/дм³

В колбу вместимостью 100 см³ помещают 24,22 г трис(оксиметил)аминометана по 4.25 [10] и растворяют приблизительно в 80 см³ особо чистой стерильной воды. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5 ед. pH, а объем — до 100 см³ особо чистой стерильной водой.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 6 мес.

6.1.5 Приготовление раствора NaCl массовой концентрации 146,2 г/дм³

В плоскодонную колбу вместимостью 100 см³ помещают 14,62 г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в 70—80 см³ особо чистой стерильной воды, затем полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и особо чистой стерильной водой доводят объем раствора до метки.

Срок хранения при комнатной температуре — не более одного года.

6.1.6 Приготовление ЦТАБ-буфера

В стеклянную колбу вместимостью 100 см³ помещают 2,0 г сухого цетилтриметиламмония бромида по 4.28 [11], далее добавляют 5 см³ раствора Трис-HCl, приготовленного по 6.1.4, 56 см³ раствора NaCl, приготовленного по 6.1.5, и 10 см³ раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2. Объем раствора доводят до 100 см³ особо чистой стерильной водой. Перемешивают на магнитной мешалке до полного растворения соли.

Срок хранения при комнатной температуре — не более одного года.

6.1.7 Приготовление ЦТАБ-раствора

В стеклянную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,5 г сухого цетилтриметиламмония бромида по 4.28 [11], и добавляют 1,6 см³ раствора NaCl, приготовленного по 6.1.5. Объем раствора доводят до 100 см³ особо чистой стерильной водой.

Срок хранения при температуре 4 °С — 5 °С — не более месяца, в морозильной камере по ГОСТ 26678 при температуре минус 20 °С — до одного года.

6.1.8 Приготовление разведенного раствора NaCl

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносят 48 см³ раствора NaCl, приготовленного по 6.1.5, и особо чистой стерильной водой доводят объем раствора до метки.

Срок хранения при комнатной температуре — не более 6 мес.

6.1.9 Раствор Taq-полимеразы по 4.31 хранят при температуре минус 20 °С не более шести месяцев.

Не допускается хранение раствора Taq-полимеразы ниже температуры минус 23 °С».

Пункты 6.2.1—6.2.6 изложить в новой редакции:

«6.2.1 Две параллельные пробы анализируемого продукта массой около 100 мг каждая помещают в две чистые стерильные микроцентрифужные пробирки по 4.15 вместимостью 1,5 см³, добавляют по 500 мм³ ЦТАБ-буфера, приготовленного по 6.1.6, перемешивают на аппарате для встряхивания по 4.10 [6] в течение 2 мин и выдерживают 15—20 мин при температуре 65 °С в термостате для микропробирок.

6.2.2 Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 6.2.1, центрифугируют при комнатной температуре в настольной центрифуге по 4.8 [4] при частоте вращения 13000 мин^{-1} в течение 10 мин.

6.2.3 Надосадочную жидкость, полученную по 6.2.2, отбирают микродозатором (обычно по 500 мм^3) и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, добавляют равный объем хлороформа по ГОСТ 20015. Содержимое перемешивают на аппарате для встряхивания в течение 2 мин и центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13000 мин^{-1} .

6.2.4 Верхнюю жидкую фазу из смеси, полученной по 6.2.3, аккуратно отбирают микродозатором в чистые микроцентрифужные пробирки, не захватывая промежуточную или нижнюю фазу. В пробирки добавляют два объема ЦТАБ-раствора, приготовленного по 6.1.7, аккуратно перемешивают, переворачивая пробирки вручную, и выдерживают 60 мин при комнатной температуре.

6.2.5 Смесь, полученную по 6.2.4, центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 мин^{-1} . Надосадочную жидкость тщательно удаляют микродозатором, а осадок растворяют в $350\text{—}600 \text{ мм}^3$ (в зависимости от объема осадка) разведенного раствора NaCl, приготовленного по 6.1.8, добавляют равный объем хлороформа по ГОСТ 20015, перемешивают на аппарате для встряхивания в течение 30 сек и центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13000 мин^{-1} .

6.2.6 Надосадочную жидкость, полученную по 6.2.5, отбирают микродозатором и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, добавляют равный объем изопропилового спирта по 4.27, аккуратно перемешивают содержимое пробирок вручную и выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре».

Подраздел 6.2 дополнить пунктами 6.2.7—6.2.9:

«6.2.7 Смесь, полученную по 6.2.6, центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13000 мин^{-1} , надосадочную жидкость аккуратно сливают, а к осадку ДНК добавляют 1 см^3 70%-ного этилового спирта, приготовленного по 6.1.3 и охлажденного до температуры $0 \text{ }^\circ\text{C} \text{—} 4 \text{ }^\circ\text{C}$, перемешивают и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 мин^{-1} .

6.2.8 Полученную надосадочную жидкость вновь тщательно удаляют, а осадок ДНК подсушивают при комнатной температуре до полного удаления этилового спирта, но не более 30 мин.

6.2.9 Осадок ДНК, полученный по 6.2.8, перерастворяют в $40\text{—}50 \text{ мм}^3$ особо чистой стерильной воды. Полученный раствор ДНК используют для проведения амПЦР.

Срок хранения раствора ДНК при температуре минус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ — до одного года».

Пункт 6.3.1.1 изложить в новой редакции:

«6.3.1.1 Готовят две микроцентрифужные пробирки вместимостью по $1,5 \text{ см}^3$ и маркируют их «M1» и «M2».

В пробирку «M1» микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): $2,5 \text{ мм}^3$ 10x буфера реакционного для ПЦР по 4.32; $2,5 \text{ мм}^3$ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.35 [14], 2 мм^3 фермента Taq-полимеразы по 4.31 [12] (концентрацией 5 Ед. акт/мм^3)*, 1 мм^3 флуоресцентного субстрата ФС по 4.36 [15], а также 1 мм^3 водного раствора праймеров «ПР-1» по 4.40 [19].

В пробирку «M2» микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): $2,5 \text{ мм}^3$ 10x буфера реакционного для ПЦР по 4.32; $2,5 \text{ мм}^3$ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.35 [14], 2 мм^3 фермента Taq-полимеразы по 4.31 [12] (концентрацией 5 Ед. акт/мм^3)*, 1 мм^3 флуоресцентного субстрата ФС по 4.36 [15], а также 1 мм^3 водного раствора праймеров «ПР-2» по 4.41 [20].

Смесь разбавляют особо чистой стерильной водой до объема 20 мм^3 (из расчета на одну анализируемую пробу) и осторожно перемешивают в течение 3—5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены. Общий объем реакционных смесей в микропробирках «M1» и «M2» для амПЦР готовят с учетом числа анализируемых проб и двух контрольных проб: положительный контроль (заведомо трансгенная ДНК по 4.37) и отрицательный контроль (заведомо нетрансгенная ДНК по 4.38)».

Пункты 7.1.1—7.1.4 изложить в новой редакции; дополнить пунктами — 7.1.5, 7.1.6:

«7.1.1 Для каждой анализируемой пробы готовят 2 чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью $0,2$ или $0,5 \text{ см}^3$, маркируя их «N₁» и «N₂», где N — номер анализируемой пробы.

* Срок хранения Taq-полимеразы после разведения при температуре от $2 \text{ }^\circ\text{C}$ до $8 \text{ }^\circ\text{C}$ — не более 2 ч.

7.1.2 Реакционные смеси для амПЦР «М1» и «М2», полученные по 6.3.1.1—6.3.1.2, микродозатором вносят в микроцентрифужные пробирки по 20 мм³ в каждую таким образом, чтобы смесь «М1» была распределена по пробиркам с индексом «N₁», а смесь «М2» — по пробиркам с индексом «N₂».

7.1.3 Анализируемую ДНК пробы N, выделенную по 6.2, вносят микродозатором по 5 мм³ в микроцентрифужные пробирки с реакционной смесью для амПЦР по 7.1.2, маркированные, соответственно, «N₁» и «N₂». При использовании амплификатора ДНК [2] без подогрева крышки в каждую микроцентрифужную пробирку с реакционной смесью вносят по 30 мм³ вазелинового масла по ГОСТ 3164 для предохранения реакционной смеси от испарения водной фазы при амПЦР. В этом случае анализируемую ДНК вносят под слой масла, в результате чего образуются водная и масляная фазы.

7.1.4 В две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 5 мм³ раствора заведомо трансгенной ДНК (положительный контроль).

7.1.5 Затем еще в две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 5 мм³ раствора заведомо нетрансгенной ДНК (отрицательный контроль).

7.1.6 Все микроцентрифужные пробирки со смесями, подготовленными по 7.1.3—7.1.5, помещают в амплификатор ДНК и проводят амПЦР по программе, указанной в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 — Программа проведения амПЦР

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Число циклов
1	95	12 мин	1
2	95	30 с	55
	51	30 с	
	72	30 с	
3	72	10 мин	1

Подраздел 7.2 изложить в новой редакции:

«7.2 Гибридизация на биологическом микрочипе»

7.2.1 Для проведения этапа гибридизации готовят N+2 микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,5 или 1,5 см³ (N — количество анализируемых проб, две другие пробирки нужны для анализа положительного и отрицательного контроля).

7.2.2 В необходимое количество микроцентрифужных пробирок микродозатором вносят по 18 мм³ гибридизационного буфера 4.33 [13]. К гибридизационному буферу в пробирку «N» добавляют по 9 мм³ водной фазы ПЦР-смесей из пробирок «N₁» и «N₂», полученных в результате проведения амПЦР по 7.1.6 и перемешивают в течение 20—30 с на аппарате для встряхивания по 4.10 с частотой вращения не менее 1500 мин⁻¹ для получения гибридизационной смеси.

7.2.3 Из каждой микроцентрифужной пробирки микродозатором отбирают по 34 мм³ гибридизационной смеси (для каждого биологического микрочипа), полученной по 7.2.2. Смесь вносят через любое из двух отверстий гибридизационной камеры, после чего оба отверстия закрывают крышкой. Гибридизацию проводят в термостате по 4.4 [3] при температуре 37 °С. Минимальное время гибридизации составляет 3 ч. Допускается гибридизация в течение ночи, но не более 16—18 ч.

7.2.4 После окончания гибридизации крышку реакционной камеры открывают и микродозатором отбирают гибридизационную смесь из камеры микрочипа. В любое из двух отверстий камеры вносят 34 мм³ дистиллированной воды по ГОСТ 6709, предварительно прогретой до температуры 37 °С. Воду выдерживают в реакционной камере биологического микрочипа в течение 1 минуты, затем отбирают. Процедуру повторяют, после чего составную крышку отсоединяют от подложки. Подложку последовательно промывают дистиллированной водой по ГОСТ 6709, этиловым спиртом по 4.26, дистиллированной водой по ГОСТ 6709 и высушивают при комнатной температуре.

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения приведена в приложении Б».

Раздел 8 изложить в новой редакции:

«8 Обработка и интерпретация результатов анализа»

8.1 Результаты гибридизации регистрируют с помощью универсального аппаратно-программного комплекса для анализа биочипов (УАПК) [1]. Инсталляция и эксплуатация комплекса осуществляется в соответствии с руководством по эксплуатации УАПК.

8.2 Производят запуск программного обеспечения, поставляемого вместе с комплексом (файл `imageware.exe`). При запуске на мониторе появляется схема биочипа с указанием отдельных ячеек и обозначением находящихся в них зондов. Названия зондов соответствуют указанным в таблице 1 и на рисунке 1.

8.3 Биологический микрочип после проведения гибридизации, промывки, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания помещают в держатель УАПК «лицевой» стороной (содержащей гелевые ячейки) вверх.

8.4 Нажимают пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части диалогового окна «Снимок». При этом происходит возбуждение флуоресценции ячеек биочипа лазерами с длиной волны 640 нм, захват флуоресцентного изображения, его обработка и выдача отчета о присутствии в исследуемом образце ДНК растительного происхождения, идентификации видоспецифичной ДНК (соя, кукуруза, картофель, рис) и наличии/отсутствии генетических элементов, используемых как детерминанты трансгенности. Применение универсального аппаратно-программного комплекса (УАПК) для анализа биологических микрочипов [1] позволяет автоматизировать все этапы регистрации и интерпретации результатов и получать заключение о наличии/отсутствии ДНК растительного происхождения в исследуемом образце, а также о наличии/отсутствии генетических детерминант трансгенности.

8.5 Анализ биологических микрочипов с прогибридизованными ПЦР-продуктами, полученными при амплификации ДНК, выделенной из различных образцов, начинают с регистрации и интерпретации гибридизационных картин положительного (заведомо трансгенной ДНК) и отрицательного контроля (заведомо нетрансгенной ДНК).

8.6 Результат анализа ДНК сои, содержащей трансгенные элементы, с использованием гибридизации на биочипе, представлен в приложении В.

8.7 В случае, если при использовании заведомо нетрансгенной ДНК регистрируют сигнал в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям фрагментов векторных конструкций и маркерных генов, это свидетельствует о получении ложноположительного результата. При этом результаты анализа остальных исследуемых образцов не учитываются. Причиной может быть загрязнение (контаминация) ГМИ реактивов и/или оборудования. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и оборудования раствором соляной кислоты по ГОСТ 3118 (0,1 моль/дм³), заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. В случае отсутствия сигналов в ячейках, содержащих зонды, специфичные к различным генетическим детерминантам трансгенности, при использовании заведомо нетрансгенной ДНК, делают заключение об отсутствии контаминации и проводят анализ образцов ДНК согласно протоколу.

8.8 Отсутствие флуоресцентных сигналов в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к гену *RBCL*, при использовании нетрансгенной растительной ДНК свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. При этом результаты анализа остальных исследуемых образцов не учитываются. Причиной могут быть потеря активности одного из компонентов реакционной смеси для амПЦР или несоблюдение условий проведения амПЦР и/или гибридизации на биологическом микрочипе. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Наличие сигнала в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, специфичные к ДНК растительного происхождения, при использовании заведомо нетрансгенной ДНК, свидетельствует об эффективно проведенной амПЦР и гибридизации на биочипе. При этом анализ образцов ДНК проводят далее согласно протоколу».

Приложение Б изложить в новой редакции:

«ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(справочное)

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения с использованием биологического микрочипа

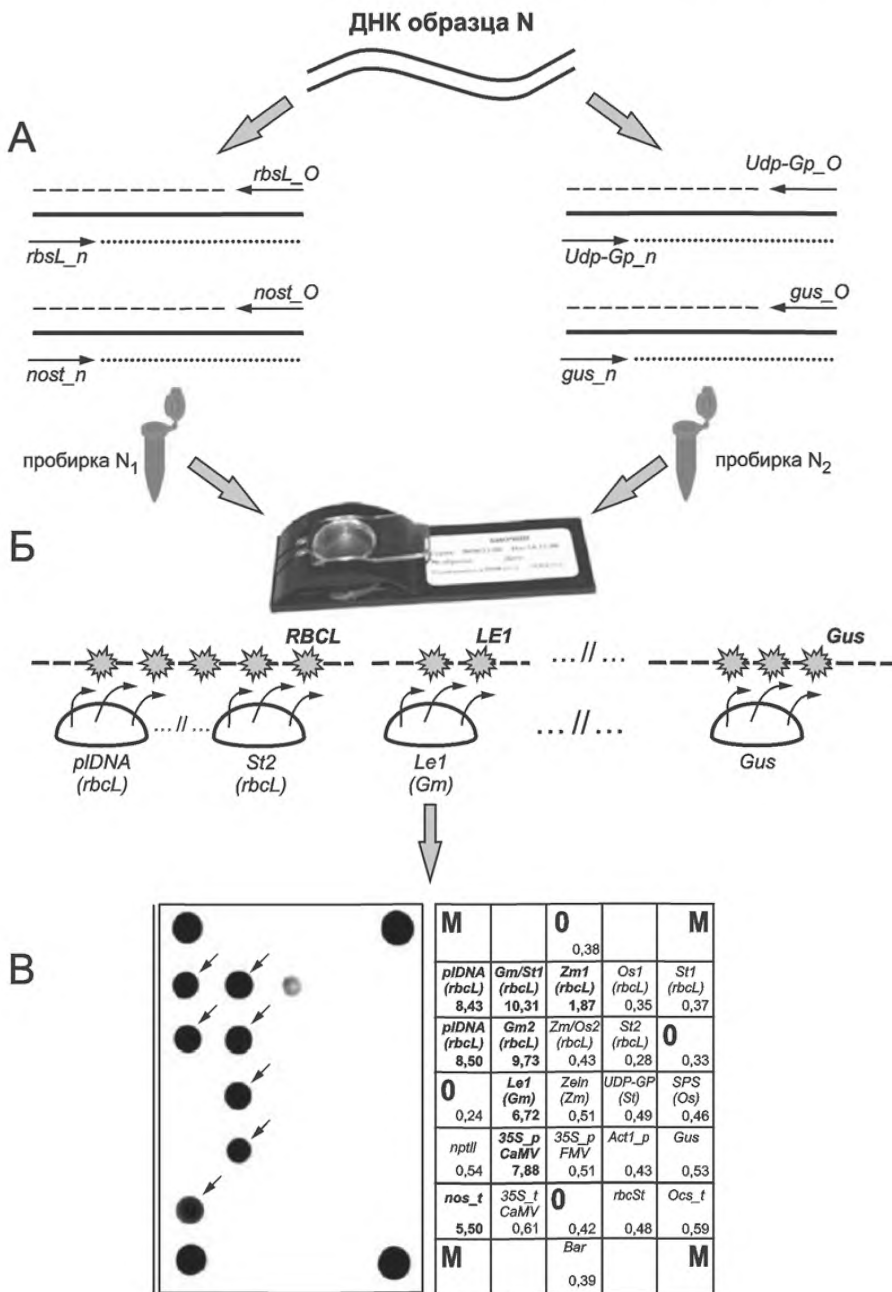


Рисунок Б.1

А — мультиплексная асимметричная амплификация ДНК образца «N» в двух независимых пробирках «N₁» и «N₂» с уникальным набором праймеров для получения преимущественно одноцепочечных флуоресцентно меченных фрагментов;

Б — гибридизация ПЦР-продуктов, полученных в независимых пробирках «N₁» и «N₂» со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на биологическом микрочипе;

В — регистрация и интерпретация флуоресцентной картины гибридизации на биологическом микрочипе».

Приложение В изложить в новой редакции:

«ПРИЛОЖЕНИЕ В
(обязательное)

**Результат анализа ДНК сои, содержащей трансгенные элементы,
с использованием гибридизации на биологическом микрочипе**

(флуоресцентная картина гибридизации, полученная в результате анализа ДНК генетически модифицированной сои и распределение нормированных сигналов ячеек биологического микрочипа)

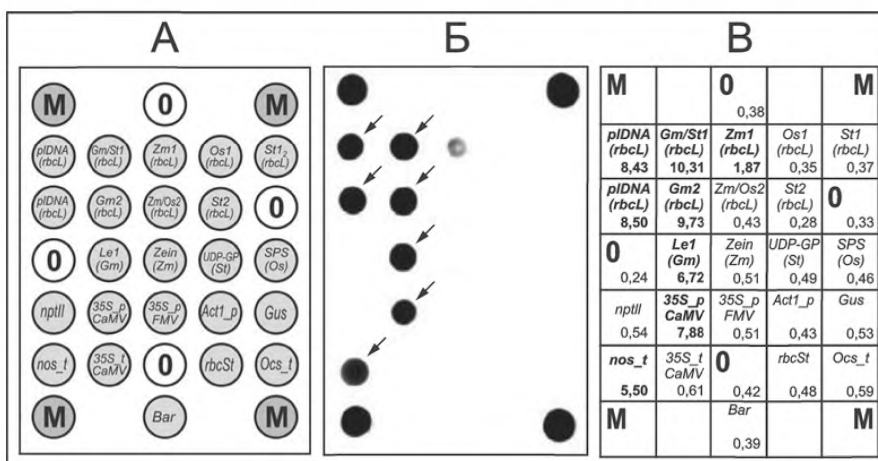


Рисунок В.1

А — схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированного источника растительного происхождения;

Б — гибридизационная картина на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР анализируемой ДНК сои, содержащей 35S-промотор, терминатор *nos*. Стрелками обозначены ячейки, в которых образовались совершенные гибридизационные дуплексы.

В — распределение нормированных сигналов ячеек биологического микрочипа. Жирным шрифтом выделены ячейки, в которых образовались совершенные гибридизационные дуплексы».

Приложение Г изложить в новой редакции:

«ПРИЛОЖЕНИЕ Г
(рекомендуемое)

Пример оформления протокола испытания

Наименование организации (испытательная лаборатория)

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от « ____ » _____ 201_ г.

Даты: поступления на испытание « ____ » _____ 201_ г.

конца испытаний « ____ » _____ 201_ г.

Продукция: _____ Котлеты «Московские»

Производитель сырья или продукции: _____ ООО «Вымпел»

Предъявитель сырья или продукции: _____ Орган сертификации «Биотест-М»

Отбор проб произведен _____ по ГОСТ 11856—89

в соответствии с нормативным документом на соответствующую однородную группу сырья или продукции

Акт отбора проб и техническое задание на испытания № 118 от 08.02.2013

Испытания проведены на основании требований ГОСТ Р 52174—2003

Номер образца: _____ 6/кс, 7/кс, 8/кс и 9/кс

Характеристика испытуемого образца (маркировка, вид и состояние упаковки, этикетки, штриховка):
Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ в образцах № 6/кс, 7/кс и 8/кс отсут-
ствует, а в образце № 9/кс присутствует.

Маркировка: _____ —

Годеи до: _____ — Штриховой код: _____

Результаты испытаний

Т а б л и ц а 1 — Нетрансгенные видоспецифические последовательности

Последовательности	Номер образца				При наличии
	6/кс	7/кс	8/кс	9/кс	
ген <i>RBCL</i>	+	+	+	+	
<i>GM/ST1(RBCL)</i>	+	+	+	+	
<i>ZM1(RBCL)</i>	–	–	–	–	
<i>OS1(RBCL)</i>	–	–	–	–	
<i>ST1₂(RBCL)</i>	+	+	–	–	
<i>GM2(RBCL)</i>	–	–	+	+	
<i>ZM/OS2(RBCL)</i>	–	–	–	–	
<i>ST2(RBCL)</i>	+	+	–	–	
<i>Le1(Gm)</i>	–	–	+	+	
<i>Zein(Zm)</i>	–	–	–	–	
<i>UDP-GP (St)</i>	+	+	–	–	
<i>SPS (Os)</i>	–	–	–	–	

Результат анализа: В образцах 7/кс и 9/кс обнаружены следующие растительные компоненты: в образце 6/кс и 7/кс обнаружено присутствие ДНК сои, а в образцах 8/кс и 9/кс обнаружено присутствие ДНК картофеля.

Т а б л и ц а 2 — Трансгенные видоспецифичные последовательности

Последовательности	Номер образца				При наличии
	6/кс	7/кс	8/кс	9/кс	
<i>nptII</i>	–	+	–	–	
<i>35S_p CaMV</i>	–	+	–	+	
<i>35S_p FMV</i>	–	–	–	–	
<i>Act1_p</i>	–	–	–	–	
<i>Gus</i>	–	–	–	–	
<i>nos_t</i>	–	–	–	+	
<i>35S_t CaMV</i>	–	–	–	–	
<i>rbcSt</i>	–	–	–	–	
<i>Ocs_t</i>	–	–	–	–	
<i>Bar</i>	–	–	–	–	

Результат анализа: В образцах 7/кс и 9/кс обнаружены следующие трансгенные компоненты: в образце 7/кс обнаружен гомолог гена *nptII*; промотор *35S CaMV* и терминатор *nos*, а в образце 9/кс обнаружены промотор *35S CaMV* и терминатор *nos*. В образцах 6/кс и 8/кс трансгенные компоненты не обнаружены. Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ, в образце 7/кс отсутствует, а в образце 9/кс присутствует.

Вывод: Все образцы содержат растительную ДНК, образец 6/кс содержит нетрансгенную ДНК сои; образец 7/кс содержит трансгенную ДНК сои; образец 8/кс содержит нетрансгенную ДНК картофеля; образец 9/кс содержит трансгенную ДНК картофеля.

Исполнители:

подпись

Иванов И.И.

Фамилия, инициалы

подпись

Петров П.П.

Фамилия, инициалы

Руководитель испытательной лаборатории _____

подпись

МП

Фамилия, инициалы

Заключение распространяется на образец, представленный на испытания». Приложение Д изложить в новой редакции:

«ПРИЛОЖЕНИЕ Д
(справочное)

Библиография

- [1] ТУ 9443-004-02699501—2006
ООО «Биочип-ИМБ»
- [2] ТУ 9642-001-4648062—98
- [3] ТУ 42-619—61
- [4] Корпорация «Эппендорф», кат. № 5425 000.014
- [5] Корпорация «Хеликон», кат. № MSH-300
- [6] Корпорация «Хеликон», кат. № CV-1500
- [7] Корпорация «Хеликон», кат. № RP-30 и RP-80
- [8] Корпорация «Хеликон», кат. № FA104; FA108;
FA 111; FA 113N
- [9] ТУ 6-09-11-1721—83
- [10] ТУ 6-09-4292—76
- [11] Корпорация «Хеликон», кат. № Am-0833
- [12] Корпорация «Силекс», кат. № E0320
- [13] ТУ 9398-003-02699501—2006
- [14] Корпорация «Силекс», кат. № N1101
- [15] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук (ИМБ РАН)
- [16] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук (ИФР РАН)
- [17] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук (ИФР РАН)
- [18] ТУ 46-22-603—75
- [19] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук (ИМБ РАН)
- [20] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук (ИМБ РАН)
- [21] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук (ИМБ РАН)
- [22] Государственный Комитет Санэпиднадзора Российской Федерации; № 06-19/52-17 от 15.06.95
- [23] ЗАО «НПФ ДНК-Технология»
- Универсальный аппаратно-программный комплекс для анализа биологических микрочипов (УАПК)
Амплификатор «Терцик МС-2»
Термостат суховоздушный ТВР-25
Микроцентрифуга настольная 5415С, 13000 мин⁻¹
Мешалка магнитная с подогревом
Аппарат для встряхивания (центрифуга — вортекс)
Штативы под микроцентрифужные пробирки
Наконечники с фильтром для микропипеток
- Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль дигидрат
Трис(оксиметил)аминометан $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$
Цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ) $[\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NBrl}]$
Фермент HotTaq-полимераза 5 Ед. акт. в мм³
Буфер гибридизационный
Раствор смеси дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по 25 мМ каждого
Флуоресцентный субстрат «ФС»
- Раствор заведомо трансгенной ДНК
около 100 нг/мм³ или 10⁶ копий/мм³
- Раствор заведомо нетрансгенной ДНК около
100 нг/мм³ или 10⁶ копий/мм³
- Баня водяная с электрическим или газовым подогревом
Раствор водный праймеров «ПР-1»
- Раствор водный праймеров «ПР-2»
- Биологические микрочипы (биочипы) гелевые с иммобилизованными олигонуклеотидами
- Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения
Компьютерная программа «Gene» для учета и интерпретации результатов, полученных при помощи ПЦР-детектора «Джин»

(Продолжение Изменения № 2 к ГОСТ Р 52174—2003)

[24] ТУ 9443-005-46482062—2003

[25] ООО «БИОМАСТЕР-ПРОМ»

ПЦР-детектор «Джин»

Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации ДНК
«СКАН-35S», «СКАН-*gus*», «СКАН-*nos*» и «СКАН-*prt*».

(ИУС № 4 2014 г.)