

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

ИЗМЕНЕНИЕ № 1 СТБ ГОСТ Р 52174-2005

**Биологическая безопасность
СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ**
Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ)
растительного происхождения с применением биологического микрочипа

**Біялагічная бяспека
СЫРАВІНА І ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ**
Метад ідэнтыфікацыі генетычна мадыфікаваных крыніц (ГМК)
расліннага паходжання з прымяненнем біялагічнага мікрачыпа

Введено в действие постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 18.04.2018 № 27

Дата введения 2018-07-01

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. Первый абзац изложить в новой редакции:

«В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА):»;

дополнить ссылкой:

«ГОСТ 20015-88 Хлороформ. Технические условия»;

дополнить примечанием:

«Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ТНПА по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться действующими взамен ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.».

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, 4.40 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-бифосфат 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. № X06166, поз. 6260–6630);

– праймеры для амплификации фрагмента терминатора гена белка теплового шока пшеницы (Асс. № X58279, поз. 10–210);

– праймеры для амплификации фрагмента маркерного гена *BAR*, определяющего устойчивость к фосфинотрицину (Асс. № AY310901, 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).».

Раздел 4 дополнить пунктом 4.41:

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

Таблица 1 – Обозначение и назначение олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Назначение олигонуклеотида
<i>plDNA (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

Окончание таблицы 1

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Назначение олигонуклеотида
<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
<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 <i>35S</i>	Специфичный зонд для идентификации <i>35S</i> промотора вируса мозаики цветной капусты
<i>35S_p FMV</i>	Промотор <i>FMV</i>	Специфичный зонд для идентификации <i>35S 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 <i>35S</i>	Специфичный зонд для идентификации <i>35S</i> 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>

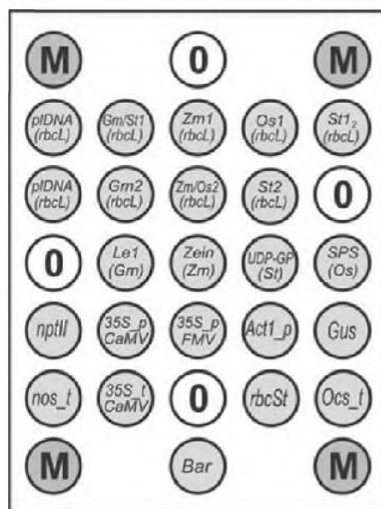


Рисунок 1 – Схема биологического микрочипа для идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения

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 M содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для автоматического вычисления интенсив-

ности 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 вышеуказанных.»

Пункт 6.1.2. Заменить значения и 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 вместимостью 1,5 см³ по 4.15, 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 13 000 мин⁻¹ в течение 10 мин.

6.2.3 Надосадочную жидкость, полученную по 6.2.2, отбирают микродозатором (обычно по 500 мм³) 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 13 000 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 пробир-

ки добавляют два объема ЦТАБ-раствора, приготовленного по 6.1.7, аккуратно перемешивают, переверачивая пробирки вручную, и выдерживают 60 мин при комнатной температуре.

6.2.5 Смесь, полученную по 6.2.4, центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13 000 мин⁻¹. Надосадочную жидкость тщательно удаляют микродозатором, а осадок растворяют в 350–600 мм³ (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 с и центрифугируют 10 мин при частоте вращения 13 000 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 ч 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 13 000 мин⁻¹, надосадочную жидкость аккуратно сливают, а к осадку ДНК добавляют 1 см³ 70%-ного этилового спирта, приготовленного по 6.1.3 и охлажденного до температуры 0 °С – 4 °С, перемешивают и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13 000 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 40–50 мм³ особо чистой стерильной воды. Полученный раствор ДНК используют для проведения амПЦР.

Срок хранения раствора ДНК при температуре минус 20 °С – до одного года.»

Пункт 6.3.1.1 изложить в новой редакции:

6.3.1.1 Готовят две микроцентрифужные пробирки вместимостью по 1,5 см³ и маркируют их М1 и М2.

В пробирку М1 микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 2,5 мм³ десятикратного буфера реакционного для ПЦР по 4.32; 2,5 мм³ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.35 [14], 2 мм³ фермента Таq-полимеразы по 4.31 [12] (концентрацией 5 ед. акт./мм³) *, 1 мм³ флуоресцентного субстрата ФС по 4.36 [15], а также 1 мм³ водного раствора праймеров ПР-1 по 4.40 [19].

В пробирку М2 микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 2,5 мм³ десятикратного буфера реакционного для ПЦР по 4.32; 2,5 мм³ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.35 [14], 2 мм³ фермента Таq-полимеразы по 4.31 [12] (концентрацией 5 ед. акт./мм³) *, 1 мм³ флуоресцентного субстрата ФС по 4.36 [15], а также 1 мм³ водного раствора праймеров ПР-2 по 4.41 [20].

Смесь разбавляют особо чистой стерильной водой до объема 20 мм³ (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 М1 и М2 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:

7.1.1 Для каждой анализируемой пробы готовят две чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 см³, маркируя их N₁ и N₂, где N – номер анализируемой пробы.

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 N₁ и N₂ соответственно. 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).»

Подраздел 7.1 дополнить пунктами 7.1.5, 7.1.6:

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.

* Срок хранения Таq-полимеразы после разведения при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 2 ч.

Таблица 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 по 4.33 [13]. К гибридизационному буферу в пробирку N добавляют по 9 мм³ водной фазы ПЦР-смесей из пробирок N_1 и N_2 , 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 1 500 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 мин, 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 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 УАПК [1]. Установка 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 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 гибридной биочипа, представлен в приложении В.

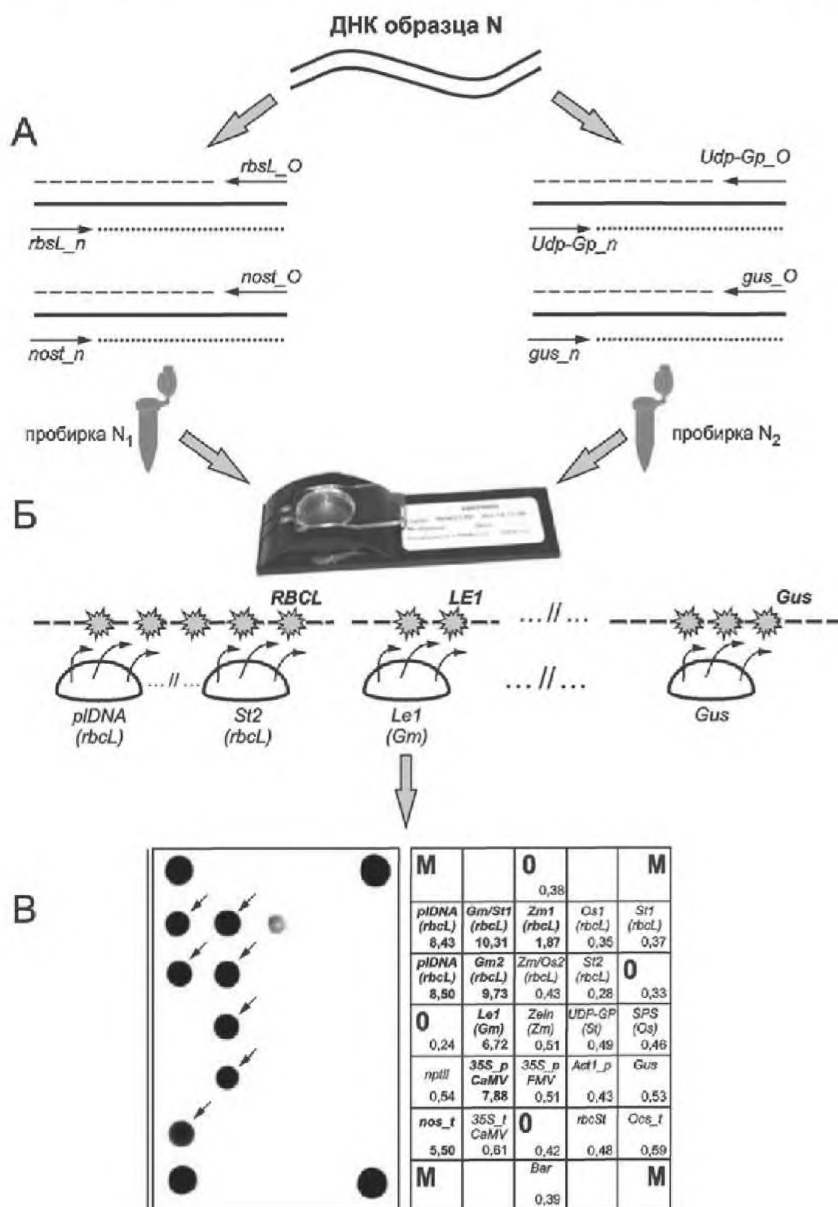
8.7 В случае если при использовании заведомо нетрансгенной ДНК регистрируют сигнал в ячейках, содержащих олигонуклеотиды, комплементарные последовательностям фрагментов векторных конструкций и маркерных генов, это свидетельствует о получении ложноположительного результата. При этом результаты анализа 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 может 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



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;

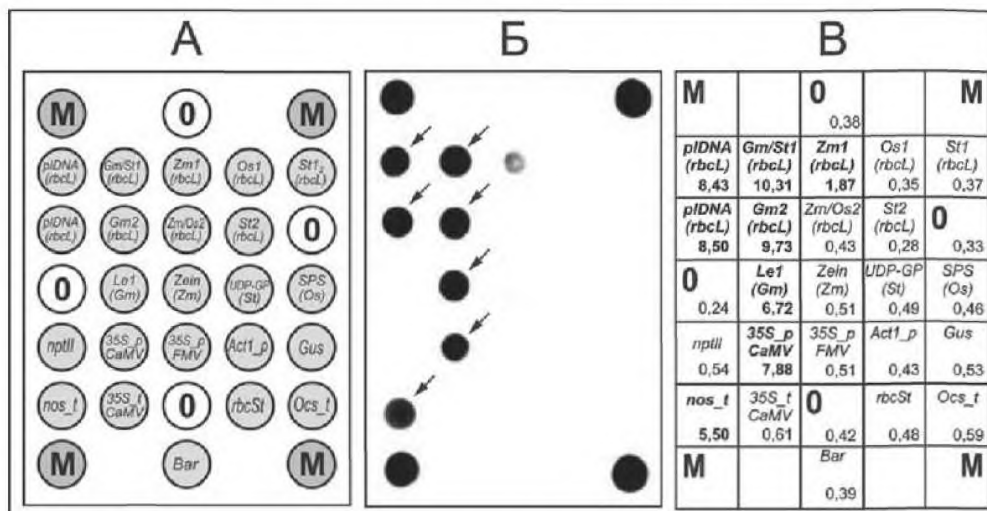
В – регистрация и интерпретация флуоресцентной картины гибридизации на биологическом микрочипе

Рисунок Б.1».

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)



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

Рисунок В.1».

Приложение Г изложить в новой редакции:

«Приложение Г
(рекомендуемое)

Пример оформления протокола испытаний

наименование организации (испытательная лаборатория)

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от «_____» _____ 20__ г.

Дата поступления на испытания «_____» _____ 20__ г.

Дата окончания испытаний «_____» _____ 20__ 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 отсутствует, а в образце № 9/кс присутствует.

Маркировка: _____

Голен до: _____ – Штриховой код: _____ –

Результаты испытаний

Таблица 1 – Нетрансгенные видоспецифичные 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 образцах 6/кс и 7/кс обнаружено присутствие ДНК сои, а в образцах 8/кс и 9/кс – присутствие ДНК картофеля.

Таблица 2 – Трансгенные видоспецифичные последовательности

Последовательности	Номер образца				
	6/кс	7/кс	8/кс	9/кс	При наличии
<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 обнаружены гомолог гена *nptII*, промотор *35S CaMV* и терминатор *nos*, а в образце 9/кс – 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 – нетрансгенную ДНК сои, образец 7/кс – трансгенную ДНК сои, образец 8/кс – нетрансгенную ДНК картофеля, образец 9/кс – трансгенную ДНК картофеля.

Исполнители:

подпись

Иванов И. И.

фамилия, инициалы

подпись

Петров П. П.

фамилия, инициалы

Руководитель испытательной лаборатории _____

подпись

М. П.

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» | Универсальный аппаратно-программный комплекс для анализа биологических микрочипов (УАПК) |
| [2] ТУ 9642-001-4648062-98 | Амплификатор «Терцик МС-2» |
| [3] ТУ 42-619-61 | Термостат суховоздушный ТВР-25 |
| [4] Корпорация «Эппендорф»,
кат. № 5425 000.014 | Микроцентрифуга настольная 5415С, 13000 мин ⁻¹ |
| [5] Корпорация «Хеликон», кат. № MSH-300 | Мешалка магнитная с подогревом |
| [6] Корпорация «Хеликон», кат. № CV-1500 | Аппарат для встряхивания (центрифуга-вортекс) |
| [7] Корпорация «Хеликон», кат. № RP-30 и
RP-80 | Штативы под микроцентрифужные пробирки |
| [8] Корпорация «Хеликон», кат. № FA104;
FA108; FA 111; FA 113N | Наконечники с фильтром для микропипеток |
| [9] ТУ 6-09-11-1721-83 | Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль дигидрат |
| [10] ТУ 6-09-4292-76 | Трис(оксиметил)аминометан [NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃] |
| [11] Корпорация «Хеликон», кат. № Ат-0833 | Цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ)
[C ₁₉ H ₄₂ NBr] |
| [12] Корпорация «Силекс», кат. № E0320 | Фермент HotTaq-полимераза 5 ед. акт. в мм ³ |
| [13] ТУ 9398-003-02699501-2006 | Буфер гибридизационный |
| [14] Корпорация «Силекс», кат. № N1101 | Раствор смеси дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ,
по 25 мМ каждого |
| [15] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) | Флуоресцентный субстрат «ФС» |
| [16] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) | Раствор заведомо трансгенной ДНК около 100 нг/мм ³ или 10 ⁶ копий/мм ³ |
| [17] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) | Раствор заведомо нетрансгенной ДНК около 100 нг/мм ³ или 10 ⁶ копий/мм ³ |
| [18] ТУ 46-22-603-75 | Баня водяная с электрическим или огнемвым подогревом |
| [19] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) | Раствор водный праймеров ПР-1 |

- [20] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) Раствор водный праймеров ПР-2
- [21] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) Биологические микрочипы (биочипы) гелевые с иммобилизованными олигонуклеотидами
- [22] Государственный комитет Санэпиднадзора Российской Федерации; № 06-19/52-17 от 15.06.95 Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения
- [23] ЗАО «НПФ ДНК-Технология» Компьютерная программа «Gene» для учета и интерпретации результатов, полученных при помощи ПЦР-детектора «Джин»
- [24] ТУ 9443-005-46482062-2003 ПЦР-детектор «Джин»
- [25] ООО «БИОМАСТЕР-ПРОМ» Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации ДНК «СКАН-35S», «СКАН-*gus*», «СКАН-*nos*» и «СКАН-*npb*»

(ИУ ТНПА № 3-2018)

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

к СТБ ГОСТ Р 52174-2005 Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 5	Отбор проб проводят по национальным стандартам	Отбор проб проводят по [25]
Приложение Д	–	[25] Методические указания МУ 2.3.2.1917-04 Пищевые продукты и пищевые добавки. Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически модифицированные аналоги

(ИУ ТНПА № 2-2010)

Биологическая безопасность

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

Біялагічная бяспека

СЫРАВІНА І ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Метад ідэнтыфікацыі генетычна мадыфікаваных крыніц (ГМК) расліннага паходжання з прымяненнем біялагічнага мікрачыпа

(ГОСТ Р 52174-2003, IDT)

Издание официальное



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

IDT

Ключевые слова: генетически модифицированные источники, идентификация генетически модифицированных источников, сырье и продукты пищевые, ассиметричная мультикомплексная полимеразная цепная реакция, биологический микрочип, гибридизация, праймер, олигонуклеотиды, последовательность ДНК, нетрансгенная ДНК, трансгенная ДНК, интенсивность флуоресценции

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 52174-2003 «Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа».

Государственный стандарт Российской Федерации разработан ТК 447 «Биологическая безопасность пищевых продуктов, кормов и товаров народного потребления и методы ее контроля», Институтом физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН и Институтом молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда 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

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ (апрель 2007 г.)

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	4
6 Подготовка к проведению анализа	5
7 Проведение анализа	7
8 Обработка результатов анализа	8
9 Требования безопасности	8
Приложение А (справочное) Определение термина.....	9
Приложение Б (справочное) Схема метода идентификации генетически модифицированных источников растительного происхождения	10
Приложение В (обязательное) Пример гибридизационной картины на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР (гибридизационная картина на экране компьютера, полученная в результате анализа генетически модифицированного картофеля, содержащего промотор 35S, гены <i>gus</i> и <i>nptII</i> и промотор <i>nos</i>)	11
Приложение Г (рекомендуемое) Пример оформления протокола испытания	12
Приложение Д (справочное) Библиография	13

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Биологическая безопасность
СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ**
**Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ)
растительного происхождения с применением биологического микрочипа**

**Біялагічная бяспека
СЫРАВІНА І ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ**
**Метад ідэнтыфікацыі генетычна мадыфікаваных крыніц (ГМК)
расліннага паходжання з прымяненнем біялагічнага мікрачыпа**

**Biological safety
Raw and food-stuffs**
**Method for the identification of genetically modified organisms (GMO)
of plant origin by using biological microchip**

Дата введения 2006-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевое сырье (в том числе посевной и посадочный материал), пищевые продукты, цветы (далее – продукт) и устанавливает метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с использованием биологического микрочипа.

Метод основан на асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции (амПЦР) с последующей гибридизацией продуктов этой амПЦР на биологическом микрочипе. Метод одновременно устанавливает наличие или отсутствие в анализируемой пробе не менее пяти различных трансгенных последовательностей ДНК. Чувствительность метода – не менее 10^{-12} г (1 пг) ДНК.

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 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) 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 9284-75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

СТБ ГОСТ Р 52174-2005

ГОСТ 9805-84 Спирт изопропиловый. Технические условия
ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 12738-77 Колбы стеклянные с градуированной горловиной. Технические условия
ГОСТ 13646-68 Термометры стеклянные ртутные для точных измерений. Технические условия
ГОСТ 21400-75 Стекло химико-лабораторное. Технические требования. Методы испытаний
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 29227-91 (ИСО 835-1-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
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 биологическая безопасность: (См. приложение А).

3.2 генетически модифицированные источники: Сырье и пищевые продукты (ингредиенты), используемые человеком в натуральном или переработанном виде, полученные из генетически модифицированных организмов или содержащие их в своем составе.

3.3 генетически модифицированный организм: Организм, генетический материал которого изменен с применением методов генной инженерии.

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

3.5 биологический микрочип: Микроматрица с ячейками, в которых иммобилизован набор олигонуклеотидов.

3.6 праймер: Последовательность односторонней ДНК длиной до 25 нуклеотидов, применяемая для проведения асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции.

3.7 асимметричная мультиплексная полимеразная цепная реакция: Полимеразная цепная реакция, где в одной пробирке с участием нескольких пар праймеров одновременно амплифицируются разные последовательности анализируемой ДНК, причем количество одного из праймеров каждой пары в несколько раз превышает количество другого праймера.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Компьютерная программа «Imageware» для анализа изображений, полученных с помощью «Чипдетектора-03» [1] или «Био-1» [23].

4.2 Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов типа «Чипдетектор-03» [2] или «Евроббио-ВТО» [24].

4.3 Амплификатор ДНК типа «Терцик» под микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2; 0,5 см³ со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее 1,5 °С/с [3].

4.4 Термостат суховоздушный типа ТВЗ-25 с рабочей температурой 37 °С, рабочий диапазон от 20 °С до 60 °С, точность поддержания температуры ± 1 °С [4].

4.5 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 высокого класса точности (условное обозначение (П) с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,0001 г.

4.6 Камера морозильная по ГОСТ 26678, обеспечивающая температуру минус 20 °С.

4.7 Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

4.8 Микроцентрифуга настольная типа 5415С с частотой вращения не менее 13000 мин⁻¹ [5].

4.9 Мешалка магнитная с подогревом [6].

4.10 Аппарат для встряхивания типа СУ-1500 с частотой вращения не менее 1500 мин⁻¹ [7].

4.11 рН-метр с набором электродов, с погрешностью измерений ± 0,1 рН.

4.12 Микродозаторы с переменным объемом дозирования: 0,5 – 10,0 мм³ (шаг 0,1 мм³, точность ± 2,5 % – 10 %, воспроизводимость 3 % – 7 %); 5,0 – 50,0 мм³ (шаг 0,5 мм³, точность 2,0 % – 5,0 %, воспроизводимость 2,5 % – 5 %); 20,0 – 200,0 мм³ (шаг 1,0 мм³, точность ± 1,5 % – 2,0 %, воспроизводимость 2 % – 3 %); 100 – 1000 мм³ (шаг 5 мм³, точность ± 1,0 % – 1,5 %, воспроизводимость 1 % – 2 %).

- 4.13 Штативы под микроцентрифужные пробирки типа RP-30 и RP-80 на 30 и 80 шт. [8].
- 4.14 Наконечники с фильтром для микродозаторов (микропипеток) с переменным объемом дозирования жидкостей до 10; 20; 200; 1000 мм³ [9].
- 4.15 Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см³ стерильные.
- 4.16 Пестик или палочка стеклянные по ГОСТ 21400 для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см³.
- 4.17 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные по ГОСТ 1770 на 25, 100, 250 и 1000 см³.
- 4.18 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические по ГОСТ 25336 вместимостью 50 – 1000 см³.
- 4.19 Пипетки стеклянные градуированные по ГОСТ 29227.
- 4.20 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.
- 4.21 Натрия гидроокись по ГОСТ 4328.
- 4.22 Кислота соляная концентрированная по ГОСТ 3118, х.ч.
- 4.23 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.
- 4.24 Этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль дигидрат (ЭДТА) [10].
- 4.25 Трис(оксиметил)аминометан [11].
- 4.26 Спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ Р 51652, х.ч.
- 4.27 Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805, х.ч.
- 4.28 Додецилсульфат натрия (SDS) [12].
- 4.29 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
- 4.30 Вода особо чистая стерильная, не содержащая ДНК, РНК и дезоксирибонуклеаз.
- 4.31 Фермент термостабильный Taq-полимераза, оптимум активности при 70 °С – 72 °С [13].
- 4.32 ПЦР буфер десятикратный (10×; 12,1 г в 1 дм³ Трис-HCL, pH 8,8; 37,28 г в 1 дм³ KCL, 5 % Твин-20, 50 % формамид; 142,83 мг в 1 дм³ MgCL₂).
- 4.33 Гуанидин тиоцианат [14].
- 4.34 N-[2-оксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота] (HEPES) [15].
- 4.35 Масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164.
- 4.36 Раствор водный дезоксирибонуклеозидтрифосфатов: дАТФ, дТТФ, дТТФ, дЦТФ с концентрацией 2 мМ каждого [16].
- 4.37 Раствор заведомо трансгенной ДНК (около 100 нг/мм³ или 10⁶ копий/мм³) [17].
- 4.38 Раствор заведомо нетрансгенной ДНК (около 100 нг/мм³ или 10⁶ копий/мм³) [18].
- 4.39 Баня водяная [19].
- 4.40 Раствор водный праймеров «ПР-1» для амплификации соответствующих участков генома, включающий следующие пары праймеров:
- праймеры на промотор 35S вируса мозаики цветной капусты:
- | | | |
|--------|------------------------------------|-----------|
| 35S_п | 5' CCT CCT CGG ATT CCA TTG CCC AG | (23 н.о.) |
| 35S_оф | 5' GTC CAT CTT TGG GAC CAC TGT CGG | (24 н.о.) |
- праймеры на маркерный ген *gus* из бактерии *Escherichia coli*:
- | | | |
|----------------|----------------------------------|-----------|
| <i>gus</i> _п | 5' AAG CCG GGC AAT TGC TGT GCC A | (22 н.о.) |
| <i>gus</i> _оф | 5' GAC CGC ATC GAA ACG CAG CAC G | (22 н.о.) |
- праймеры на промотор *nos* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*:
- | | | |
|----------------|--------------------------------------|-----------|
| <i>nos</i> _п | 5' CGA TGA CGC GGG ACA AGC CGT | (21 н.о.) |
| <i>nos</i> _оф | 5' GAC CTT AGG CGA CTT TTG AAC GCG C | (25 н.о.) |
- праймеры на маркерный ген *nptII* из транспозона Tn5 бактериального происхождения:
- | | | |
|----------------|----------------------------------|-----------|
| <i>npt</i> _п | 5' GTG TTC CGG CTG TCA GCG CAG G | (22 н.о.) |
| <i>npt</i> _оф | 5' CGC AAG GAA CGC CCG TCG TGG | (21 н.о.) |
- праймеры на терминатор *ocs* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*:
- | | | |
|----------------|------------------------------------|-----------|
| <i>ocs</i> _п | 5' GCG AGA CGC CTA TGA TCG CAT GAT | (24 н.о.) |
| <i>ocs</i> _оф | 5' GAA ACC GGC GGT AAG GAT CTG AGC | (24 н.о.) |

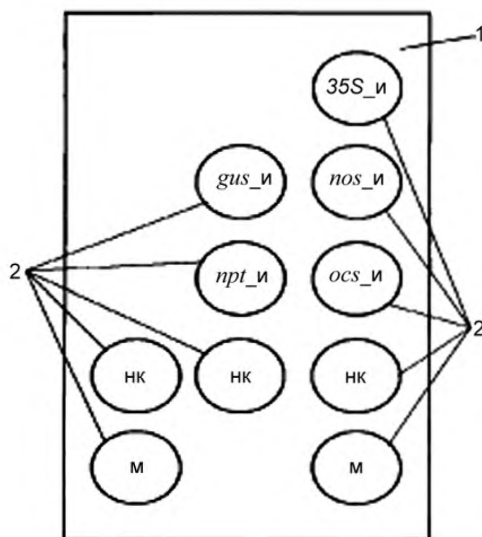
Примечание – В обозначениях праймеров индекс «_п» означает «прямой», индекс «_оф» означает «обратный флуоресцентно меченый»; н.о. – нуклеотидные остатки [20].

Биологический микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами, приведенными в таблице 1 [21]:

Таблица 1 – Олигонуклеотиды, иммобилизованные на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Последовательность лигонуклеотида
35S_и	Промотор 35S	5' GCC ATC ATT GCG ATA AAG G
<i>gus</i> _и	Ген <i>gus</i>	5' CTG GTA TCA GCG CGA A
<i>nos</i> _и	Промкатор <i>nos</i>	5' GCT AAG CAC ATA CGT CAG AA
<i>npt</i> _и	Ген <i>nptII</i>	5' GGC AGC GCG GCT ATC
<i>ocs</i> _и	Терминатор <i>ocs</i>	5' TTC TGT TGT GCA CGT TGT A

Примечание – Индекс «_и» означает «иммобилизованный».



1 – предметное стекло;
2 – гелевые ячейки

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

Биологический микрочип представляет собой стандартное стекло предметное по ГОСТ 9284 для световой микроскопии, на поверхности которого в определенном порядке расположены 10 микроскопических ячеек (рисунок 1), заполненные полиакриламидным гелем. Каждая из пяти верхних ячеек содержит индивидуальный ковалентно иммобилизованный олигонуклеотид (*35S*, *gus*, *nos*, *npt* или *ocs*). Три ячейки с индексом «НК» не содержат ранее перечисленных индивидуальных ковалентно иммобилизованных олигонуклеотидов и выполняют роль отрицательного контроля гибридизации. Две ячейки с индексом «М» содержат ковалентно связанный флуоресцентный краситель и предназначены для однозначной ориентации биологического микрочипа. Поверхность биологического микрочипа с ячейками должна быть закрыта пластиковой крышкой с отверстиями, которая вместе с предметным стеклом образует замкнутое пространство, предназначенное для проведения гибридизации анализируемой пробы.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов 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 (в том числе посевного и посадочного материала), пищевых продуктов, цветов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Приготовление растворов

6.1.1 Приготовление раствора гидроокиси натрия концентрации 40 г/дм³

В колбу стеклянную плоскодонную по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см³ помещают 4,0 г сухой натрия гидроокиси по ГОСТ 4328 и растворяют в 100 см³ особо чистой стерильной воды по 4.30. После охлаждения раствора до комнатной температуры его переливают в специальную щелочеустойчивую пластиковую плотно закрывающуюся емкость.

Срок хранения при комнатной температуре – не более одного года.

6.1.2 Приготовление раствора ЭДТА концентрации 186, 12 г/дм³

В стеклянную плоскодонную колбу вместимостью 100 см³ помещают 18,61 г ЭДТА по 4.24, растворяют в 80 см³ особо чистой стерильной воды при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке [6]. Затем раствором гидроокиси натрия по 6.1.1 доводят рН раствора до 8,0. Полученный раствор переливают в колбу мерную по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см³ и особо чистой стерильной водой доводят объем этого раствора до метки.

Срок хранения в холодильнике по ГОСТ 26678 при температуре 4 °С – 5 °С – не более 6 мес.

6.1.3 Приготовление 70 %-ного раствора этилового спирта

В колбу мерную по ГОСТ 12738 вместимостью 200 см³ вносят 140 см³ 96 %-ного этилового спирта высокой степени очистки по ГОСТ Р 51652, добавляют 52 см³ особо чистой стерильной воды и перемешивают.

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

6.1.4 Приготовление гибридационнного буфера

В стеклянный стакан или плоскодонную колбу вместимостью 300 – 500 см³ помещают точно отмеренные количества: 44,33 (± 0,01) г гуанидин тиоцианата – по 4.33 [14], 4,88 (± 0,01) г N'-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновой кислоты] натриевой соли (HEPES) по 4.34 [15]. Затем пипеткой стеклянной по ГОСТ 29227 вместимостью 5 см³ приливают 3,75 (± 0,05) см³ раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2, и цилиндром вместимостью 250 см³ добавляют 200 см³ особо чистой стерильной воды. Стакан с раствором помещают на магнитную мешалку по 4.9 [6] и перемешивают до полного растворения компонентов. Доводят значение рН буфера до 7,5 (± 0,1) добавлением раствора гидроокиси натрия, приготовленного по 6.1.1. Полученный раствор из стакана переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³, доводят объем до метки особо чистой стерильной водой и разливают по 50 см³ в плоскодонные колбы с притертыми пробками.

Срок хранения при температуре 2 °С – 8 °С – не более 12 мес.

6.1.5 Приготовление раствора Трис-НСI концентрации 242,2 г/дм³

В колбу вместимостью 100 см³ помещают 24,22 г Трис (оксиметил) аминометана по 4.25 [11] и растворяют в 80 см³ особо чистой стерильной воды. Кислотой соляной концентрированной по ГОСТ 3118 доводят рН раствора до 7,5, а объем – до 100 см³ особо чистой стерильной водой.

Срок хранения при комнатной температуре – не более 6 мес.

6.1.6 Приготовление раствора хлористого натрия концентрации 146,2 г/дм³

В плоскодонную колбу вместимостью 100 см³ помещают 14,62 г натрия хлористого 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 до метки. Срок хранения при комнатной температуре – не более одного года.

6.1.7 Приготовление раствора 20 %-ного додецилсульфата натрия (SDS) [12]

В стеклянную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20 г сухого додецилсульфата натрия по 4.27 и добавляют 80 см³ особо чистой стерильной воды. Растворяют при плавном перемешивании на магнитной мешалке и одновременном нагревании до температуры 40 °С – 50 °С до полного растворения.

Срок хранения при комнатной температуре – не более одного года.

6.1.8 Приготовление буфера экстракции

В мерной колбе вместимостью 50 см³ смешивают 5 см³ раствора Трис-НСl, приготовленного по 6.1.5, 5 см³ раствора NaCl, приготовленного по 6.1.6, 1,25 см³ раствора 20 %-ного SDS, приготовленного по 6.1.7, и 2,5 см³ раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2; каждый раствор отбирают отдельной стеклянной пипеткой. Объем раствора доводят до 50 см³ особо чистой стерильной водой.

Срок хранения при температуре 4 °С – 5 °С – не более двух недель, в камере морозильной по ГОСТ 26678 при температуре минус 20 °С – не более одного года.

6.1.9 Раствор Таq-полимеразы по 4.31 хранят при температуре минус 20 °С не более одного года. Не допускается хранение раствора Тая-полимеразы ниже температуры минус 23 °С.

6.2 Приготовление пробы для анализа (выделение ДНК)

6.2.1 Две навески каждого анализируемого продукта массой 60 – 80 мг помещают в две чистые стерильные микроцентрифужные пробирки по 4.15 вместимостью 1,5 см³, в течение 15 – 20 с доводят до состояния однородной смеси пестиком по ГОСТ 21400 при комнатной температуре и сразу микродозатором добавляют по 400 мм³ буфера экстракции, приготовленного по 6.1.8.

6.2.2 Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 6.2.1, интенсивно встряхивают в течение 5 с на аппарате для встряхивания по 4.10 [7], быстро нагревают на водяной бане [19] до температуры 65 °С и выдерживают при этой температуре 15 – 20 мин, периодически осторожно перемешивая содержимое.

6.2.3 Микроцентрифужные пробирки со смесью, приготовленной по 6.2.2, центрифугируют при комнатной температуре в настольной центрифуге по 4.8 [5] при частоте вращения 13000 мин⁻¹ в течение 5 мин.

6.2.4 Надосадочную жидкость, полученную по 6.2.3, отбирают по 300 мм³ и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, содержащие по 300 мм³ спирта изопропилового по ГОСТ 9805. Содержимое перемешивают, выдерживают 5 мин при комнатной температуре и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 мин⁻¹.

6.2.5 Надосадочную жидкость по 6.2.4 тщательно удаляют микродозатором, а осадок ДНК, полученный по 6.2.4, промывают 1 см³ 70 %-ного этилового спирта, приготовленного по 6.1.3 и охлажденного до температуры 0 °С – 4 °С, центрифугируют аналогично 6.2.4. Полученную надосадочную жидкость вновь тщательно удаляют, а осадок ДНК подсушивают при комнатной температуре до полного удаления этилового спирта, но не более 30 мин.

6.2.6 Осадок ДНК, полученный по 6.2.5, перерастворяют в 40 – 50 мм³ особо чистой стерильной воды. Полученный раствор ДНК используют для проведения амПЦР.

Срок хранения раствора ДНК при температуре минус 20 °С – не более одного года.

6.3 Подготовка асимметричной мультиплексной ПЦР

6.3.1 Приготовление реакционной смеси для амПЦР*

6.3.1.1 В микроцентрифужную пробирку вместимостью 1,5 см³ микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 3 мм³ 10× буфера реакционного для ПЦР по 4.32; 3 мм³ смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.36 [16], 2,5 мм³ фермента Таq-полимеразы по 4.31 [13] (концентрацией 5 Ед. акт/мм³)**, а также водный раствор праймеров по 4.40 [20] в следующих концентрациях (нг/дм³):

35S_п/35S_оф – 15,32/81,02;

gus_п/gus_оф – 3,75/37,59;

nos_п/nos_оф – 3,61/84,74;

*npt_п/npt*_оф* – 7,51/36,01;

ocs_п/ocs_оф – 8,18/41,41.

Смесь разбавляют особо чистой стерильной водой до объема 27 мм³ (из расчета на одну анализируемую пробу) и осторожно перемешивают в течение 3 – 5 с на аппарате для встряхивания, не допуская образования пены. Общий объем реакционной смеси 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).

* Реакционную смесь для амПЦР готовят непосредственно перед анализом при температуре не выше 20 °С.

** Срок хранения Таq-полимеразы после разведения при температуре от 2 °С до 8 °С – не более 2 ч.

6.3.1.2 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 6.3.1.1, осаждают кратковременным 10 – 15-секундным центрифугированием на настольной центрифуге при частоте вращения 1500 – 3000 мин⁻¹ и сразу же используют для проведения анализа.

6.3.2 Все этапы амПЦР должен проводить квалифицированный специально обученный персонал в соответствии с требованиями [22]. Для проведения амПЦР допускается использовать только стерильную лабораторную посуду и новые стерильные микроцентрифужные пробирки. При проведении амПЦР каждую микроцентрифужную пробирку открывают только перед отбором или внесением анализируемой пробы, а по окончании манипуляции сразу же закрывают. Запрещается открывать одновременно несколько микроцентрифужных пробирок с анализируемыми пробами и оставлять их открытыми длительное время. Каждую анализируемую пробу отбирают микродозатором с новым стерильным наконечником с фильтром.

7 Проведение анализа

7.1 Проведение асимметричной мультиплексной ПЦР

7.1.1 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 6.3.1.2, микродозатором вносят в чистые микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2 или 0,5 см³ по 27 мм³ в каждую.

7.1.2 Анализируемую ДНК, выделенную по 6.2, вносят микродозатором по 3 мм³ в микроцентрифужные пробирки с реакционной смесью для амПЦР по 7.1.1. При использовании амплификатора ДНК по 4.3 [3] без подогрева крышки в каждую микроцентрифужную пробирку с реакционной смесью вносят по 30 мм³ масла вазелинового 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.

7.1.3 В две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 3 мм³ раствора заведомо трансгенной ДНК (положительный контроль) и раствора заведомо нетрансгенной ДНК (отрицательный контроль).

7.1.4 Все микроцентрифужные пробирки со смесями, полученными по 7.1.2, и растворами, подготовленными по 7.1.3, помещают в амплификатор ДНК и проводят амПЦР по программе, указанной в таблице 2.

Таблица 2 – Программа проведения амПЦР

Шаг программы	Температура, °С	Время инкубации	Число циклов
1	95	5 мин	1
2	95	30 с	37
	62	30 с	
	72	30 с	
3	72	5 мин	1

7.2 Гибридизация на биологическом микрочипе

7.2.1 В необходимое количество микроцентрифужных пробирок микродозатором вносят по 24 мм³ гибридизационного буфера, приготовленного по 6.1.4. Затем к гибридизационному буферу добавляют по 12 мм³ водной фазы ПЦР-смеси, полученной в результате проведения амПЦР по 7.1.4, 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.

7.2.2 Из каждой микроцентрифужной пробирки микродозатором отбирают по 28 мм³ гибридизационной смеси (для каждого биологического микрочипа), полученной по 7.2.1, и всю смесь помещают на поверхность биологического микрочипа через отверстие в пластиковой крышке. Гибридизацию проводят в термостате [4] при температуре 37 °С в течение 18 ч.

7.2.3 После окончания гибридизации пластиковые крышки снимают, каждый биологический микрочип трижды промывают водой дистиллированной по ГОСТ 6709 при температуре 25 °С и высушивают при комнатной температуре.

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

8 Обработка результатов анализа

8.1 Визуализацию гибридизационной картины на биологическом микрочипе для анализируемой пробы осуществляют с помощью аппаратно-программного комплекса для анализа флуоресценции биологических микрочипов «Чипдетектор-03» [2] и компьютерной программы Imageware [1] или «Био-1» [23].

8.2 Полученную на экране компьютера гибридизационную картину для анализируемой пробы сравнивают с гибридизационной картиной для положительного контроля (заведомо трансгенной ДНК) и гибридизационной картиной для отрицательного контроля (заведомо нетрансгенной ДНК). Пример гибридизационной картины флуоресцентных продуктов амПЦР в гелевых ячейках биологического микрочипа приведен в приложении В. Наличие высокого уровня специфического флуоресцентного сигнала в гелевых ячейках биологического микрочипа, содержащих иммобилизационные олигонуклеотиды (для промоторов *35S* и *nos*, терминатора *ocs*, генов *gus* или *nptII*), свидетельствует о присутствии конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о трансгенности анализируемой ДНК. Низкий уровень флуоресцентных сигналов в гелевых ячейках биологического микрочипа после гибридизации, сравнимый с уровнем фоновой флуоресценции отрицательного контроля, но не выше установленного порога чувствительности в программе Imageware, указывает на отсутствие конкретных чужеродных последовательностей ДНК в анализируемой пробе, т. е. о нетрансгенности анализируемой ДНК.

8.3 Интерпретация результатов

8.3.1 Высокий уровень флуоресценции одной, нескольких или всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, превышающий заданный в программе Imageware [1] порог чувствительности, свидетельствует о наличии генетически модифицированных источников (ГМИ) в анализируемом продукте.

8.3.2 Низкий уровень флуоресценции всех пяти гелевых ячеек биологического микрочипа, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, близкий к фоновой флуоресценции отрицательных контролей и не достигающий заданного в программе Imageware порога чувствительности, свидетельствует об отсутствии генетически модифицированных источников (ГМИ) в анализируемом продукте.

8.3.3 Высокий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо нетрансгенной ДНК свидетельствует о получении ложноположительного результата. Причиной может быть загрязнение ГМИ реактивов и/или оборудования. В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и оборудования раствором соляной кислоты (1 моль/дм³), заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ. Полученный при повторном анализе низкий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо нетрансгенной ДНК свидетельствует о достоверном результате, который является окончательным.

8.3.4 Низкий уровень (отсутствие) флуоресцентного сигнала при использовании заведомо трансгенной ДНК свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. 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. Полученный при повторном анализе высокий уровень флуоресценции гелевых ячеек при использовании заведомо трансгенной ДНК свидетельствует о достоверном результате, который является окончательным.

9 Требования безопасности

9.1 При выполнении всех работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

9.2 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.

9.3 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 должно быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

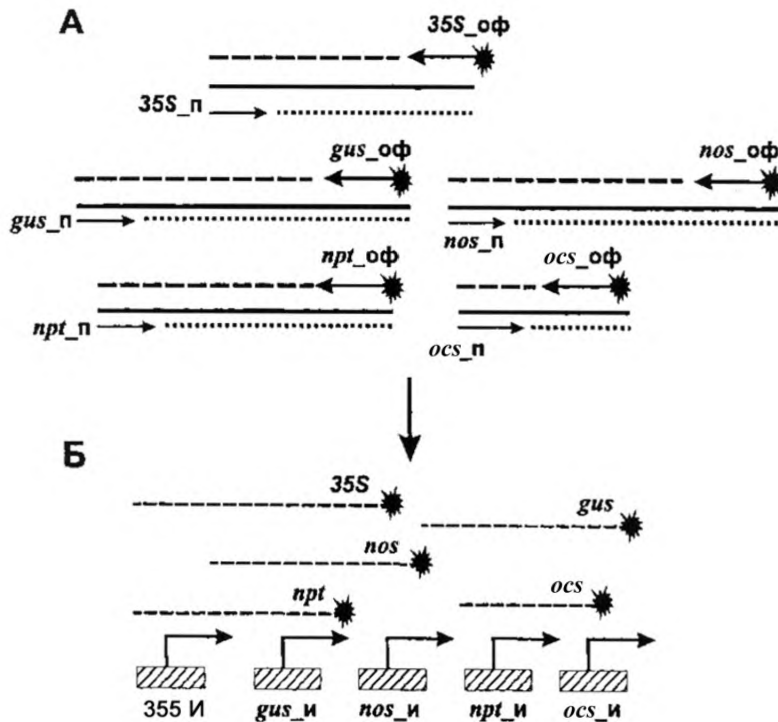
Приложение А
(справочное)

Определение термина

Биологическая безопасность: Защищенность человека, общества и окружающей среды от негативного воздействия токсических, аллергенных, канцерогенных, мутагенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генноинженерно модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

Приложение Б
(справочное)

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников
растительного происхождения

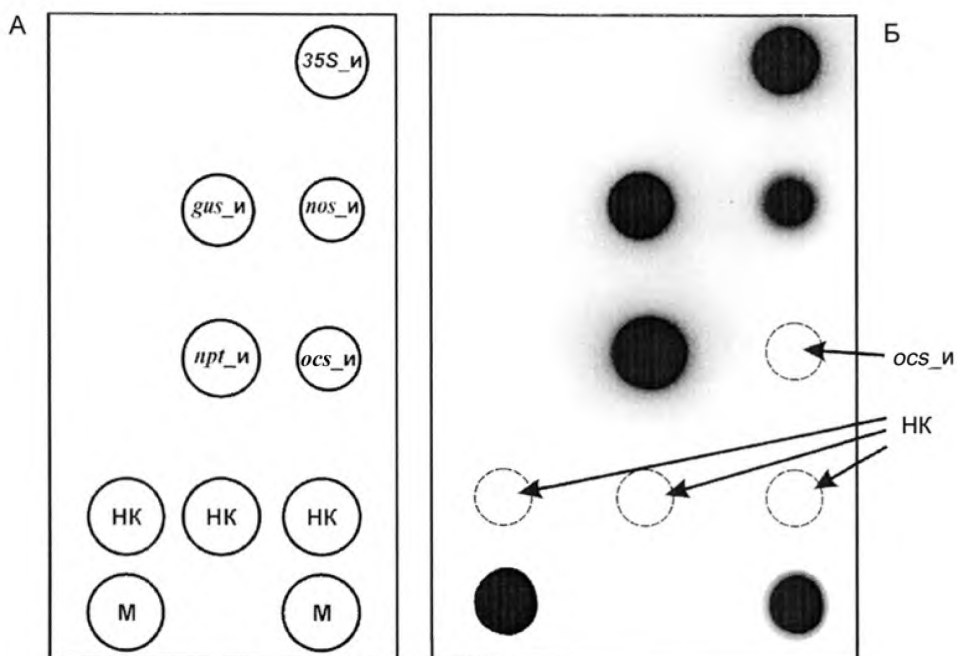


А – амПЦР с использованием флуоресцентно меченых праймеров (индекс «_оф»);
Б – гибридизация ПЦР-продуктов со специфическими олигонуклеотидами,
иммобилизованными на биологическом микрочипе (индекс «_и»)

Рисунок Б.1

Приложение В
(обязательное)

Пример гибридационной картины на биологическом микрочипе
флуоресцентных продуктов амПЦР
(гибридационная картина на экране компьютера, полученная в результате анализа
генетически модифицированного картофеля, содержащего промотор 35S,
гены *gus* и *nptII* и промотор *nos*)



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

Б – гибридационная картина на биологическом микрочипе флуоресцентных продуктов амПЦР-анализируемой ДНК, содержащей промотор 35S, гены *gus* и *nptII*, а также промотор *nos*. Пунктиром обозначены гелевые ячейки биологического микрочипа с уровнем флуоресценции, близким к фоновой, не достигающим заданного в программе Imageware порога чувствительности

Рисунок В.1

Приложение Г
(рекомендуемое)

Пример оформления протокола испытания

Наименование организации (испытательная лаборатория)

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

№ _____ от « _____ » _____ 200 ____ г.

Дата поступления на испытание « _____ » _____ 200 ____ г.

Дата конца испытаний « _____ » _____ 200 ____ г.

Продукция: _____ Картофель семенной _____

Производитель сырья или продукции: _____ ООО «Вымпел» _____

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

Отбор проб произведен _____ ГОСТ 11856-89 _____

(в соответствии с ТНПА на соответствующую однородную группу сырья или продукции)

Акт отбора проб и техническое задание на испытания № 5 от 01.12.200 ____ г.

Испытания проведены на основании требований ГОСТ Р 52174-2003 _____

Номер образца _____ 6/2004, 7/2004, 8/2004 и 9/2004 _____

Характеристика испытуемого образца (маркировка, вид и состояние упаковки, этикетки, штриховка) _____

Маркировка _____

Годен до _____ Штриховой код _____

Результаты испытаний

Номер образца	Трансгенные последовательности				
	<i>35S</i>	<i>gus</i>	<i>nos</i>	<i>nptII</i>	<i>ocs</i>
6/2004	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
7/2004	Присутствует	Присутствует	Отсутствует	Присутствует	Присутствует
8/2004	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
9/2004	Присутствует	Отсутствует	Присутствует	Отсутствует	Отсутствует

Результат анализа: В образцах 7/2004 и 9/2004 обнаружены следующие трансгенные компоненты: в образце № 7/2004 обнаружены гомологи генов *gus* и *nptII*; промоторы *35S*, *ocs*, а в образце № 9/2004 обнаружены промоторы *35S* и *nos*. В образцах № 6/2004 и 8/2004 трансгенные компоненты не обнаружены. Маркировка на упаковке, информирующая о наличии в продукте ГМИ в образцах № 6/2004, 7/2004 и 8/2004 отсутствует, а в образце № 9/2004 присутствует.

Исполнители:

Руководитель испытательной лаборатории

М.П.

Заключение распространяется на образец, представленный на испытания.

Приложение Д (справочное)

Библиография

- | | |
|---|---|
| [1] Центр биологических микрочипов ИМБ РАН | Компьютерная программа «Imageware» для анализа изображений, полученных с помощью «Чипдектора-03» |
| [2] ТУ 9443-001-02699501-2003 | Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов «Чипдектор-03» |
| [3] ТУ 9642-001-4648062-98 | Амплификатор «Терцик МС-2» |
| [4] ТУ 42-619-61 | Термостат суховоздушный ТВ3-25 |
| [5] Корпорация «Эппендорф», кат. № 5425000.014 | Микроцентрифуга настольная 5415С, 13000 мин ⁻¹ |
| [6] Корпорация «Хеликон», кат. № MSH-300 | Мешалка магнитная с подогревом |
| [7] Корпорация «Хеликон», кат. № CV-1500 | Аппарат для встряхивания (центрифуга-вортекс) |
| [8] Корпорация «Хеликон», кат. № RP-30 и № RP-80 | Штативы под микроцентрифужные пробирки |
| [9] Корпорация «Хеликон», кат. № FA 104; FA 108; FA 113N | Наконечники с фильтром для микропипеток |
| [10] ТУ 6-09-11-1721-83 | Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль дигидрат |
| [11] ТУ 6-09-4292-76 | Трис(оксиметил)аминометан [NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃] |
| [12] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № L-6026 | Додецилсульфат натрия (SDS) |
| [13] Корпорация «Сигма Алдрич» («Sigma»), кат. № Д 1806 | Фермент Таq-полимераза 5 Ед. акт./мм ³ |
| [14] Корпорация «Хеликон», кат. № Am-038-0.5 | Гуанидин тиоционат [CH ₃ N ₃ -HSCN] |
| [15] Корпорация «Хеликон», кат. № Am-0485-01 | N-[2-оксиэтил]пиперазин-N'-[этансульфоновая кислота] (HEPES) [C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄ SNa] |
| [16] Корпорация «Хеликон», кат. № H-4044-0.4 | Раствор смеси дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ, по 25 мМ каждого |
| [17] ИФР РАН | Раствор заведомо трансгенной ДНК около 100 нг/мм ³ или 10 ⁶ копий/мм ³ |
| [18] ИФР РАН | Раствор заведомо нетрансгенной ДНК около 100 нг/мм ³ или 10 ⁶ копий/мм ³ |
| [19] ТУ 46-22-603-75 | Баня водяная с электрическим или огневым подогревом |
| [20] Центр биологических микрочипов ИМБ РАН | Раствор водный праймеров «ПР-1» |
| [21] Центр биологических микрочипов ИМБ РАН | Микрочипы гелевые с иммобилизованными олигонуклеотидами |
| [22] Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения | Государственный комитет Санэпиднадзора Российской Федерации; № 06-19/52-17 от 15.06.95 |
| [23] ООО «Биоконтроль» | Компьютерная программа «Био-1» |
| [24] ООО «Биоконтроль» | Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции «Евробио-ВТО» |

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. 2,32 Уч.- изд. л. 0,90 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.