

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биологическая безопасность

СЫРЬЕ И ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

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

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

Дата введения 2004–07–01

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 мультикомплексной полимеразной цепной реакции (далее – 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 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
- ГОСТ 3118—77 Кислота соляная. Технические условия
- ГОСТ 3164—78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия
- ГОСТ 4233—77 Натрий хлористый. Технические условия
- ГОСТ 4328—77 Натрия гидроокись. Технические условия
- ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия
- ГОСТ 9284—75 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
- 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 ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

### 3 Определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

- 3.1 **биологическая безопасность:** В соответствии с приложением А.
- 3.2 **генетически модифицированные источники:** Сырье и пищевые продукты (компоненты), 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 геномной инженерии.
- 3.4 **геномная 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 однотожевой 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].
- 4.2 Комплекс аппаратно-программный для анализа флуоресценции биологических микрочипов типа «Чипдетектор-03» [2].
- 4.3 Амплификатор ДНК типа «Терцик» под микроцентрифужные пробирки вместимостью 0,2, 0,5 см<sup>3</sup> со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее 1,5 °С/с [3].
- 4.4 Термостат суховоздушный типа ТВ3-25 с рабочей температурой 37 °С. рабочий диапазон от 20 °С до 60 °С, точность поддержания температуры ±1 °С [4].
- 4.5 Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 высокого класса точности (условное обозначение (II)) 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<sup>-1</sup> [5].
- 4.9 Мешалка магнитная с подогревом [6].
- 4.10 Аппарат для встряхивания типа CV-1500 с частотой вращения не менее 1500 мин<sup>-1</sup> [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 мм<sup>3</sup> (шаг — 0,1 мм<sup>3</sup>, точность ±2,5 %—10,0 %, воспроизводимость 3 %—7 %); 5,0—50,0 мм<sup>3</sup> (шаг — 0,5 мм<sup>3</sup>, точность ±2,0 %—5,0 %, воспроизводимость 2,5 %—5 %); 20,0-200,0 мм<sup>3</sup> (шаг - 1,0 мм<sup>3</sup>, точность ±1,5 %—2,0 %, воспроизводимость 2 %—3 %); 100—1000 мм<sup>3</sup> (шаг — 5 мм<sup>3</sup>, 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 мм<sup>3</sup> [9].
- 4.15 Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 0,2; 0,5 и 1,5 см<sup>3</sup> стерильные.
- 4.16 Пестик или палочка стеклянные по ГОСТ 21400 для микроцентрифужных пробирок вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>.
- 4.17 Цилиндры стеклянные мерные лабораторные по ГОСТ 1770 на 25, 100, 250 и 1000 см<sup>3</sup>.
- 4.18 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические по ГОСТ 25336 вместимостью 50—1000 см<sup>3</sup>.
- 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) j i()),
- 4.25 Трис(оксиметил)аминомстан [Т1].

## ГОСТ Р 52174-2003

- 4.26 Спирт этиловый ректификованный 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 Таq-полимераза, оптимум активности при 70 °С—72 °С [13].  
 4.32 ПЦР буфер десятикратный (10х; 12,1 г в 1 дм<sup>3</sup> Трис-НСl, рН 8,8; 37,28 г в 1 дм<sup>3</sup> КСl, 5% Твин-20, 50 % формамид; 142,83 мг в 1 дм<sup>3</sup> MgCl<sub>2</sub>).  
 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, дГТФ, дТТФ, дЦТФ с концентрацией 2 мМ каждого [16].  
 4.37 Раствор заведомо трансгенной ДНК (около 100 нг/мм<sup>3</sup> или 10<sup>6</sup> копий/мм<sup>3</sup>) [17].  
 4.38 Раствор заведомо нетрансгенной ДНК (около 100 нг/мм<sup>3</sup> или 10<sup>6</sup> копий/мм<sup>3</sup>) [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 35,5" 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*:

*gus*\_п 5' AAG CCG GGC AAT TGC TGT GCC A (22 н.о.)  
*gus*\_оф 5' GAC CGC ATC GAA ACG CAG CAC G (22 н.о.)

праймеры на промотор *nos* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*:

*nos*\_п 5' CGA TGA CGC GGG ACA AGC CGT (21 н.о.)  
*nos*\_оф 5' GAC CTT AGG CGA CTT TTG AAC GCG C (25 н.о.)

праймеры на маркерный ген *nptII* из транспозона Тп5 бактериального происхождения:

*npt*\_п 5' GTG TTC CGG CTG TCA GCG CAG G (22 н.о.)  
*nrt*\_оф 5' CGC AAG GAA CGC CCG TCG TGG (21 н.о.)

праймеры на терминатор *ocs* из агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*:

*ocs*\_п 5' GCG AGA CGC CTA TGA TCG CAT GAT (24 н.о.)  
*ocs*\_оф 5' GAA ACC GGC GGT AAG GAT CTG AGC (24 н.о.)

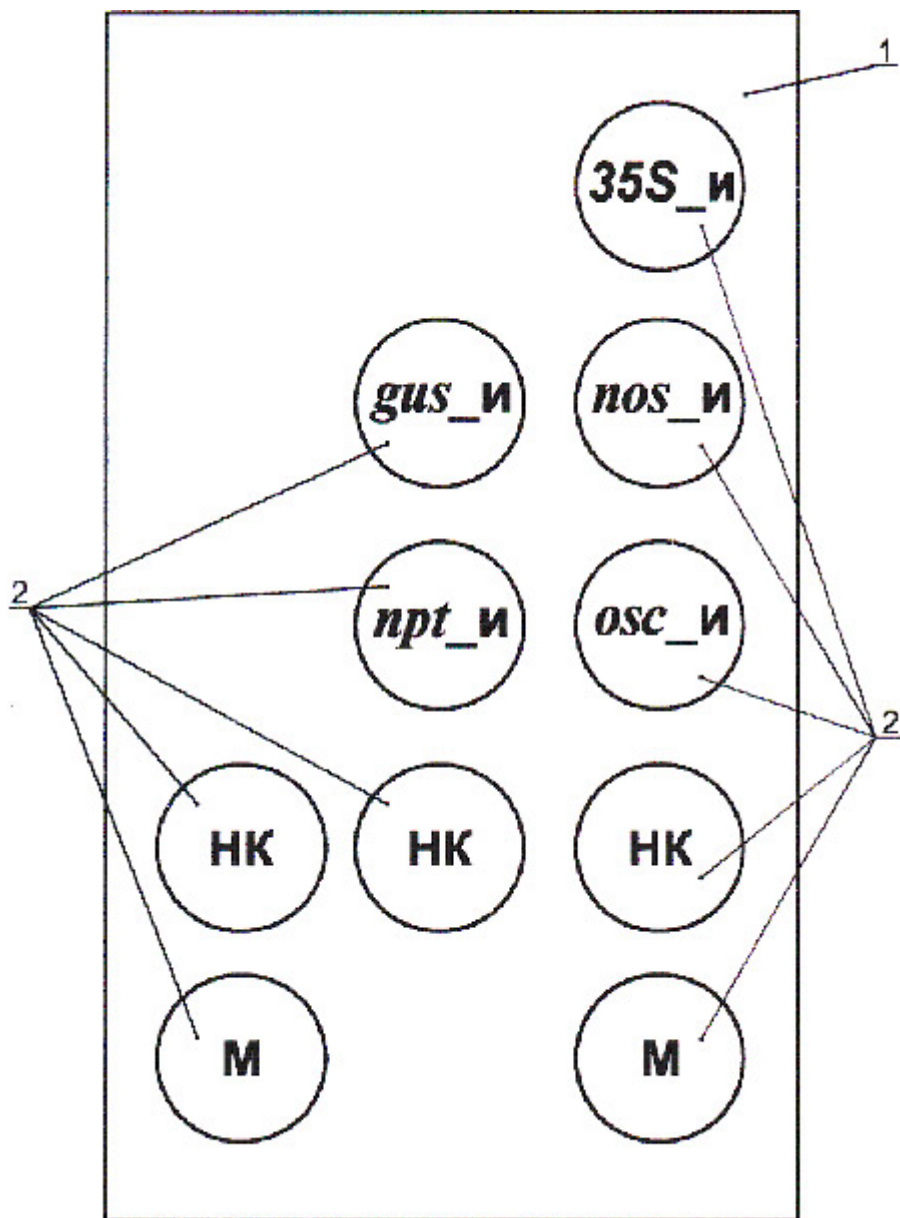
Примечание — В обозначениях праймеров индекс «п» означает «прямой», индекс «оф» означает «обратный флуоресцентномеченый»; и.о. - нуклеотидные остатки [20].

4.41 Биологический микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами, приведенными в таблице 1 [2Г]:

Т а б л и ц а 1 — Олигонуклеотиды, иммобилизованные на биологическом микрочипе

Наименование олигонуклеотида	Детектируемая мишень	Последовательность олигонуклеотида
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	Промотор <i>nos</i>	5' GCT AAG CAC ATA CGT CAG AA
<i>npt</i> _и	Ген <i>nptII</i>	5' GGG 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 предметное стекло 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 *osc*). 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.

### 6.1 Приготовление растворов

#### 6.1.1 Приготовление раствора NaOH концентрации 40 г/дм<sup>3</sup>

В стеклянную плоскодонную колбу по ГОСТ 1770 вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 4,0 г сухой гидроокиси натрия по ГОСТ 4328 и растворяют в 100 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды по 4.30. После охлаждения раствора до комнатной температуры его переливают в специальную щелочустойчивую пластиковую плотно закрывающуюся емкость. Срок хранения при комнатной температуре — не более одного года.

#### 6.1.2 Приготовление раствора ЭДТА концентрации 186,12 г/дм<sup>3</sup>

В стеклянную плоскодонную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 18,61 г ЭДТА по 4.24, растворяют в 80 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке [6]. Затем раствором гидроокиси натрия по 6.1.1 доводят pH раствора до 8,0. Полученный раствор переливают в мерную колбу по ГОСТ 12738 вместимостью 100 см<sup>3</sup> 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 мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> по ГОСТ 12738 вносят 140 см<sup>3</sup> 96 %-ного этилового спирта высокой степени очистки по ГОСТ Р 51652, добавляют 52 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды и перемешивают. Срок хранения при температуре 4 °С—5 °С — не более 6 мес.

#### 6.1.4 Приготовление гибридационного буфера

В стеклянный стакан или плоскодонную колбу вместимостью 300—500 см<sup>3</sup> помещают точно отмеренные количества: 44,33 (±0,01) г гуанидин тиоцианата — по 4.33 [114], 4,88 (±0,01) г N-12-гидроксиэтилпиперазин-1'-[2-этансульфоновой кислоты) натриевой соли (HEPES) по 4.34 [115]. Затем стеклянной пипеткой по ГОСТ 29227 вместимостью 5 см<sup>3</sup> приливают 3,75 (±0,05) см<sup>3</sup> раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2, и цилиндром вместимостью 250 см<sup>3</sup> добавляют 200 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды. Стакан с раствором помещают на магнитную мешалку по 4.9 [6] и перемешивают до полного растворения компонентов. Доводят значение pH 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 см<sup>3</sup>, доводят объем до метки особо чистой стерильной водой и разливают по 50 см<sup>3</sup> в плоскодонные колбы с притертыми пробками. Срок хранения при температуре 2 °С—8 °С — не более 12 мес.

#### 6.1.5 Приготовление раствора Трис-HCl концентрации 242,2 г/дм<sup>3</sup>

В колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 24,22 г Трис (оксиметил) аминметана по 4.25 [11] и растворяют приблизительно в 80 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды. Концентрированной соляной кислотой по ГОСТ 3118 доводят pH раствора до 7,5, а объем — до 100 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной водой. Срок хранения при комнатной температуре — не более 6 мес.

#### 6.1.6 Приготовление раствора NaCl концентрации 146,2 г/дм<sup>3</sup>

В плоскодонную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> помещают 14,62 г хлористого натрия по ГОСТ 4233, растворяют в 70—80 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной воды, затем полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> помещают 20 г сухого додецилсульфата натрия по 4.27 и добавляют 80 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> смешивают 5 см<sup>3</sup> раствора Трис-HCl, приготовленного по 6.1.5, 5 см<sup>3</sup> раствора NaCl, приготовленного по 6.1.6, 1,25 см<sup>3</sup> раствора 20 %-ного SDS, приготовленного по 6.1.7, и 2,5 см<sup>3</sup> раствора ЭДТА, приготовленного по 6.1.2; каждый раствор отбирают отдельной стеклянной пипеткой. Объем раствора доводят до 50 см<sup>3</sup> особо чистой стерильной водой. Срок хранения при температуре 4 °С—5 °С — не более двух недель, в морозильной камере 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 Таq-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 см<sup>3</sup> в течение 15-20 с доводят до состояния однородной смеси пестиком по ГОСТ 21400 при комнатной температуре и сразу микродозатором добавляют по 400 мм<sup>3</sup> 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<sup>-1</sup> в течение 5 мин.

6.2.4 Надосадочную жидкость, полученную по 6.2.3, отбирают по 300 мм<sup>3</sup> и переносят в чистые микроцентрифужные пробирки, содержащие по 300 мм<sup>3</sup> изопропилового спирта по ГОСТ 9805. Содержимое перемешивают, выдерживают 5 мин при комнатной температуре и центрифугируют 5 мин при частоте вращения 13000 мин<sup>-1</sup>.

6.2.5 Надосадочную жидкость по 6.2.4 тщательно удаляют микродозатором, а осадок ДНК, полученный по 6.2.4, промывают 1 см<sup>3</sup> 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 мм<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> микродозатором вносят (из расчета на каждую анализируемую пробу): 3 мм<sup>3</sup> 10х буфера реакционного для ПЦР по 4.32; 3 мм<sup>-1</sup> смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов по 4.36 [16], 2,5 мм<sup>3</sup> фермента Таq-полимеразы по 4.31 [13] (концентрацией 5 Ед. акт/мм<sup>3</sup>)\*\*, а также водный раствор праймеров по 4.40 [20] в следующих концентрациях (нг/дм<sup>3</sup>):

353\_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.

\* 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.

Смесь разбавляют особо чистой стерильной водой до объема 27 мм<sup>3</sup> (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).

6.3.1.2 Реакционную смесь для амПЦР, полученную по 6.3.1.1. осаждают кратковременным (10—15 с) центрифугированием на настольной центрифуге при частоте вращения 1500—3000 мин<sup>-1</sup> 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 см<sup>3</sup> по 27 мм<sup>1</sup> в каждую.

7.1.2 Анализируемую ДНК, выделенную по 6.2, вносят микродозатором по 3 мм<sup>3</sup> 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 мм<sup>3</sup> 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.

7.1.3 В две другие микроцентрифужные пробирки микродозатором вносят по 3 мм<sup>3</sup> 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.

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

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

### 7.2 Гибридизация на биологическом микрочипе

7.2.1 В необходимое количество микроцентрифужных пробирок микродозатором вносят по 24 мм<sup>3</sup> гибридизационного буфера, приготовленного по 6.1.4. Затем к гибридизационному буферу добавляют по 12 мм<sup>3</sup> 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<sup>-1</sup> для получения гибридизационной смеси.

7.2.2 Из каждой микроцентрифужной пробирки микродозатором отбирают по 28 мм<sup>3</sup> 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 дистиллированной водой 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].

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 *iptII*), 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 контролем 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/дм<sup>3</sup>), 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.

9.1 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 приточновытяжной 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 ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное)

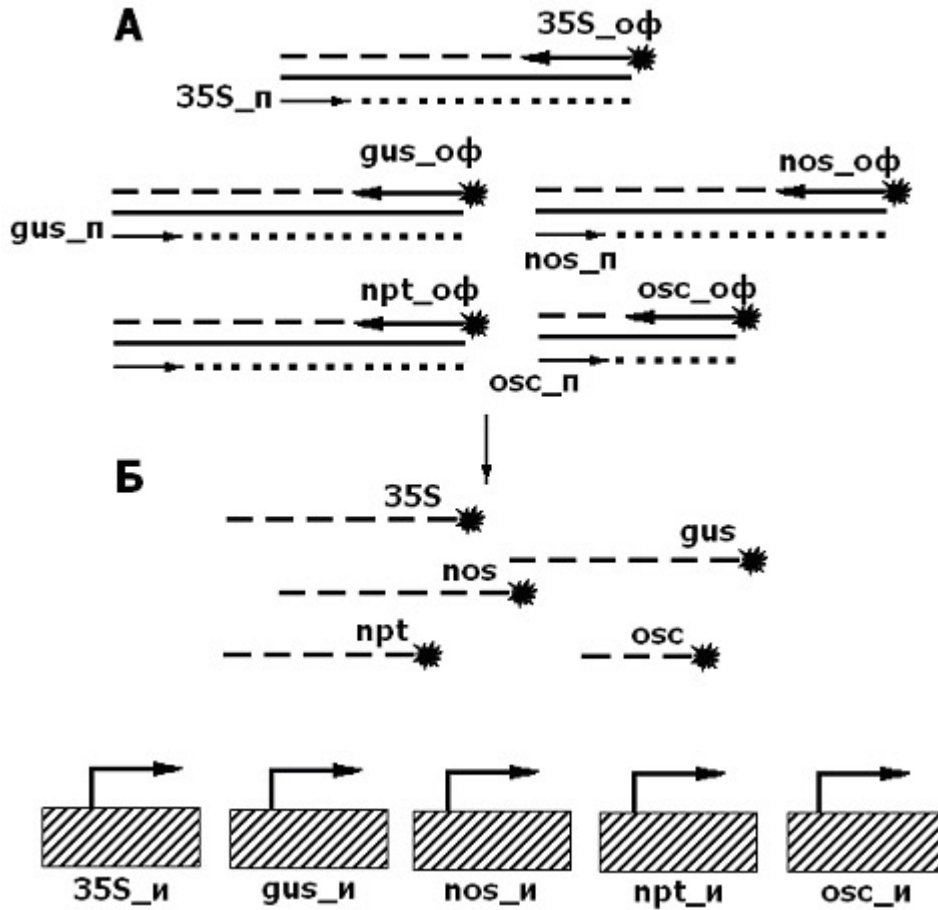
### Определение термина

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



ПРИЛОЖЕНИЕ Б  
(справочное)

Схема метода идентификации генетически модифицированных источников  
растительного происхождения



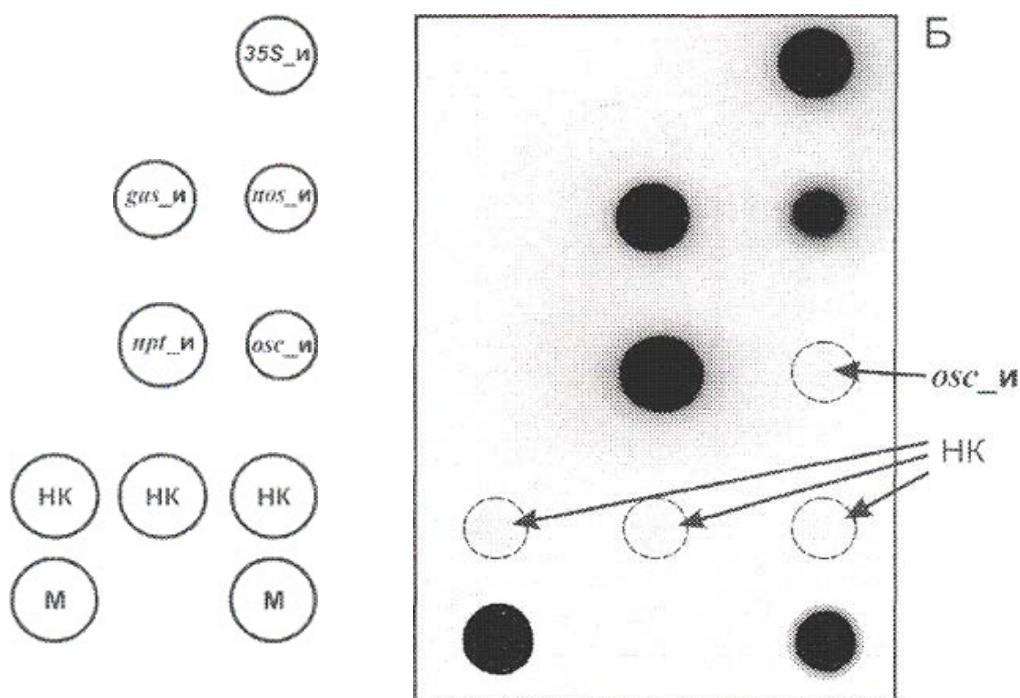
А — амПЦР с использованием флуоресцентно-меченных праймеров (индекс «\_оф»);

Б — 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 геле вые 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.

Даты поступления на испытание: «\_\_» \_\_\_\_\_ 200\_\_ г.

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 нормативным документов на соответствующую однородную группу сырья или продукции)

Акт отбора проб и техническое задание на испытания № \_\_\_\_\_ от 01.12.200\_\_ г.

Испытания проведены на основании требований ГОСТ Р 52174-2003

Номер образца 6/2004; 7/2004; 8/2004; 9/2004

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

\_\_\_\_\_

Маркировка \_\_\_\_\_

Годен до \_\_\_\_\_ Штриховой код \_\_\_\_\_

Результаты испытаний

Трансгенные последовательности

Номер образца	35S	gus	nos	<i>nrpII</i>	OCS
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
				_____	

ГОСТ Р 52174-2003

Результат анализа: **В образцах 7/2004 и 9/2004 обнаружены следующие трансгенные компоненты: в образце ; 7/2004 обнаружены гомологи генов *gus* и *prtII*, промоторы *35S*, *osc*, а в образце 9/2004 обнаружены промоторы *35S* и *nos*. В образцах № 6/204 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

\_\_\_\_\_

подпись

\_\_\_\_\_

фамилия, инициалы

\_\_\_\_\_

подпись

\_\_\_\_\_

фамилия, инициалы

Руководитель испытательной лаборатории \_\_\_\_\_

подпись

МП

\_\_\_\_\_

фамилия, инициалы

Заключение распространяется на образец, представленный на испытания

ГОСТ Р 52174-2003

---

УДК 663/.664:543.06:006.354	OKC	65.140	H11	C11-13	OKCTY	9109
		65.160	H13	C21		9209
		67.060	H17	C23-C25		9709
		67.080	H23	C32-C36		
		67.100	H27	C41-C45		
		67.120	H31-H34	C52		
		67.140	H36			
		67.140.30	H41-H43			
		67.160	H51-H56			
		67.180	H62			
		67.190	H65			
		67.200	H68			
		67.220	H72-H74			
		67.230	H81			
			H97			

---