

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

**ЛАБОРАТОРНЫЙ СОВЕТ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

**Качественное и количественное определение генетически
модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в
пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием
тест-систем и оборудования производства
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»**

Методические рекомендации

№

Издание официальное

Москва 2008

Качественное и количественное определение генетически
модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в
пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием
тест-систем и оборудования производства
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»

Методические рекомендации

Москва 2008

1. Разработаны: ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Д.Д. Абрамов, Д.Ю. Трофимов, Д.В. Ребриков, Л.П. Алексеев), ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (И.В. Брагина, М.В. Зароченцев, Т.В. Воронцова, Т.Н. Потапова, А.Р. Аитова, Т.П. Власова).
2. Утверждены и введены в действие Главным врачом ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии», председателем Лабораторного совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.И. Верещагиным.
3. Введены впервые.

Содержание

1.	Общие положения и область применения.....	5
2.	Нормативные ссылки.....	6
3.	Сущность метода.....	7
3.1.	Качественное определение ГМО	7
3.2.	Количественное определение ГМО	8
3.3.	Этапы определения ГМО.....	9
4.	Требования к помещениям и технике безопасности.....	10
4.1.	Общие требования.....	10
4.2.	Правила работы с тест-системами и оборудованием.....	10
5.	Оборудование, материалы и реактивы.....	11
5.1.	Оборудование и материалы.....	11
5.2.	Реактивы.....	11
6.	Отбор, хранение и подготовка проб пищевых продуктов для анализа.....	12
6.1.	Отбор образцов.....	13
6.2.	Подготовка проб к анализу.....	13
6.3.	Хранение и транспортирование проб.....	14
7.	Порядок проведения исследования.....	14
7.1.	Выделение ДНК из образцов пищевых продуктов и продовольственного сырья с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ЦТАБ».....	14
7.2.	Качественное определение ГМО.....	15
7.3.	Количественное определение ГМО.....	18
	Приложение 1. Схема качественного и количественного определения ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология».....	21

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач ФГУЗ «Федеральный
центр гигиены и эпидемиологии»,
председатель Лабораторного совета
Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

_____ А.И. Верещагин
« » _____ 2008 г.

МР №

**Качественное и количественное определение генетически
модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в
пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием
тест-систем и оборудования производства
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»**

Методические рекомендации

1. Общие положения и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации содержат описание методов качественного и количественного определения ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем и оборудования производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Описаны методы направленные на выявление регуляторных последовательностей (промотора 35S вируса мозаики цветной капусты и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens*), последовательностей ДНК, характерных для сои и кукурузы, а также определения соотношения промотора 35S и ДНК сои, соотношения промотора 35S и ДНК кукурузы.

1.2. Методические рекомендации разработаны в соответствии с Федеральным законом от 30 марта 1999г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

1.3. Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях организаций Роспотребнадзора, осуществляющих контроль за качеством и безопасностью продовольственного сырья и пищевых

продуктов, в т.ч. импортируемых в Российскую Федерацию, гигиеническую оценку и выдачу санитарно-эпидемиологических заключений, в лабораториях других организаций, аккредитованных в установленном порядке.

1.4. Методические рекомендации могут применяться при контроле растительного сырья и продуктов питания на наличие генетически модифицированных организмов на этапах поставки на производство, санитарно-эпидемиологической экспертизы, государственной регистрации, закупки, ввоза в Российскую Федерацию и реализации.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон от 30 марта 1999г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (с изменениями т 30 декабря 2001г., 10 января, 30 июня 2003г., 22 августа 2004г.).

2.2. Федеральный закон от 2 января 2000г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» (с изм. и доп. от 30 декабря 2001г., 10 января, 30 июня 2003г., 22 августа 2004г., 9 мая, 5, 31 декабря 2006г.).

2.3. Федеральный закон от 5 июня 1996г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (с изм. и доп. от 12 июля 2000г.).

2.4. Федеральный закон от 12 июля 2000г. № 96-ФЗ «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».

2.5. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 6 апреля 1999г. № 7 «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».

2.6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16 сентября 2003г. № 149 «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов».

2.7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 8 ноября 2000г. № 14 «О порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».

2.8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 декабря 2004г. № 13 «Об усилении надзора за пищевыми продуктами, полученными из генетически модифицированных источников».

2.9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2006 № 28 «Об усилении надзора за производством и оборотом пищевых продуктов».

- 2.10.Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 08. 12. 2006 № 32 «О надзоре за пищевыми продуктами, содержащими ГМО».
- 2.11.Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.11. 2007 № 80 «О надзора за оборотом пищевых продуктов, содержащих ГМО».
- 2.12.Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПин 2.3.2. 1078 – 01.
- 2.13.Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.СанПин 2.3.2. 2227 – 07. изм. №5 к СанПин 2.3.2. 1078 – 01
- 2.14.Методические указания «Организация работы лабораторий, проводящих исследования с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности методом полимеразной цепной реакции». МУ 1.3.1888-04.
- 2.15.Методические указания «Определение генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции». МУК 4.2.1902-04.
- 2.16.Методические указания «Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в продуктах питания». МУК 4.2.1913-04.
- 2.17.ГОСТ Р 52173-2003. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения.

3. Сущность метода

Метод выявления ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье растительного происхождения с помощью тест-систем производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология» основан на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов амплификации после завершения реакции с помощью ПЦР-детектора или в режиме «реального времени» с помощью детектирующего амплификатора.

3.1. Качественное определение ГМО

На этапе качественного определения ГМО в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяется комплект реагентов «ПРОБА-ЦТАБ» и тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология».

Комплект реагентов «ПРОБА-ЦТАБ» предназначен для выделения ДНК из проб пищевых продуктов и продовольственного сырья.

Тест-система «ФЛАНК-ГЕН» предназначена для выявления ДНК промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (далее по тексту – промотор

35S) и терминатора NOS *Agrobacterium tumefaciens* (далее по тексту – терминатор NOS).

Тест-система «СКАН-СОЯ» предназначена для выявления последовательности ДНК, характерной для сои (*Glycine max*).

Тест-система «СКАН-КУКУРУЗА» предназначена для выявления последовательности ДНК, характерной для кукурузы (*Zea mays*).

Тест-системы производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология» основаны на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой. В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведет к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

В тест-системах «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет отдельно регистрировать результаты амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта», который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» производятся в двух вариантах: предусматривающем детекцию результатов амплификации после завершения реакции с помощью ПЦР-детектора (формат «FLASH») или в режиме «реального времени» с помощью детектирующего амплификатора (формат «Real-time»).

3.2. Количественное определение ГМО

На этапе количественного определения ГМО в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени» применяются тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА».

Тест-система «КВАНТУМ-П СОЯ» предназначена для определения процентного содержания промотора 35S относительно геномной ДНК сои (*Glycine max*) в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья, содержащих сою.

Тест-система «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» предназначена для определения процентного содержания промотора 35S относительно геномной ДНК кукурузы (*Zea mays*) в пробах пищевых продуктов и продовольственного сырья, содержащих кукурузу.

Расчет содержания ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои (кукурузы) производится автоматически, по окончании реакции ПЦР, с использованием калибровочной прямой, строящейся на основании тестирования калибровочных стандартов при каждой новой постановке

При изготовлении калибровочных стандартов, входящих в состав тест-систем «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» применяются сертифицированные референсные материалы производства ERM (European Reference Materials).

3.3.Этапы определения ГМО

Качественное и количественное определение ГМО в пищевых продуктах растительного происхождения с помощью тест-систем и оборудования производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология» состоит из следующих этапов:

- выделение ДНК из исследуемого образца, с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ЦТАБ»
- тестирование выделенной ДНК с помощью тест-системы «ФЛАНК-ГЕН» в соответствии с инструкцией по применению.
- образцы ДНК, положительные по результатам тестирования с помощью тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», дополнительно исследуются с помощью тест-систем «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» в соответствии с инструкциями по применению.
- для количественного определения промотора 35S в образцах ДНК, положительных по результатам исследования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН» и «СКАН-СОЯ» применяют тест-систему «КВАНТУМ-П СОЯ» в соответствии с инструкцией по применению.
- для количественного определения промотора 35S в образцах ДНК, положительных по результатам исследования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН» и «СКАН-КУКУРУЗА» применяют тест-систему «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» в соответствии с инструкцией по применению.

Схема проведения анализа представлена в приложении 1.

Примечания:

- образцы ДНК, положительные по результатам тестирования с помощью тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», и отрицательные по результатам тестирования с помощью тест-систем «СКАН-СОЯ» и «СКАН-

КУКУРУЗА» требуют дополнительного изучения (тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» не применяют)

- образцы ДНК, положительные по результатам исследования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ» и «СКАН-КУКУРУЗА» одновременно, требуют дополнительного изучения (тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ» и «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» не применяют)
- образцы ДНК, положительные по результатам тестирования с помощью тест-систем «ФЛАНК-ГЕН» и «СКАН-КУКУРУЗА», для которых получено значение «0% ГМИ» при исследовании с помощью тест-системы «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» требуют дополнительного изучения (в т.ч. исследования на наличие ДНК кукурузы линии GA-21)
- определение количественного содержания ГМО конкретных линий/сортов проводится с применением методик, предоставляемых разработчиками данных ГМО.

4. Требования к помещениям и техника безопасности

4.1. Общие требования

4.1.1. Общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать требованиям Методических указаний МУ 1.3.1888-04. «Организация работы лабораторий, проводящих исследования с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности методом полимеразной цепной реакции».

4.2. Правила работы с тест-системами и оборудованием

4.2.1. Все компоненты наборов реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2.2. Работать с наборами следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.2.3. При работе с наборами следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.2.4. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.2.5. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

4.2.6. Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.2.7. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы

реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.2.8. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.2.9. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ.

5. Оборудование, материалы и реактивы

5.1. Оборудование и материалы

5.1.1. Амплификатор «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») для комплектов в формате «Flash» или детектирующий амплификатор ДТ-322 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») для комплектов в формате «Real-time»;

5.1.2. ПЦР-детектор «ДЖИН» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология») для комплектов в формате «Flash»;

5.1.3. Центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;

5.1.4. Термостат твердотельный, поддерживающий температуру 65°C;

5.1.5. Микроцентрифуга-вортекс;

5.1.6. Пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;

5.1.7. Пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;

5.1.8. Наконечники одноразовые вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;

5.1.9. Наконечники одноразовые с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;

5.1.10. Штативы для микропробирок на 0.2 мл

5.1.11. Штативы для микропробирок на 0.6 мл

5.1.12. Штативы для микропробирок на 1.5 мл

5.1.13. Перчатки одноразовые перчатки резиновые;

5.1.14. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678;

5.1.15. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 2000 г. ГОСТ 24104;

5.1.16. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89;

5.1.17. Ножницы медицинские;

5.1.18. Скальпели хирургические ГОСТ 21240;

5.1.19. Ступки фарфоровые с пестиком.

5.2. Реактивы

5.2.1. Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ПРОБА-ЦТАБ», включает (на 50 образцов):

- смесь №1, по 23мг 5 пробирок;
- раствор №2, 12,5 мл 1 флакон;
- раствор №3, 12,5 мл 1 флакон;
- раствор №4, 5 мл 1 флакон;
- раствор №5, 25 мл 1 флакон;
- раствор №6, 38 мл 1 флакон;
- раствор №7, 50 мл 1 флакон;
- раствор №8, 50 мл 1 флакон.

5.2.2. Тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ», «СКАН-КУКУРУЗА», включают (на 50 образцов):

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 50 пробирок;
- раствор Taq-полимеразы, по 500 мкл 1 пробирка;
- буферный раствор «ПЦР-буфер», 200 мкл 1 пробирка;
- минеральное масло, 1,0 мл 1 пробирка;
- положительный контрольный образец ДНК, 150 мкл 1 пробирка

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец ДНК.

Буферный раствор «ПЦР-буфер» – включен только в тест-системы формата «Flash».

В зависимости от способа детекции результатов амплификации тест-системы «ФЛАНК-ГЕН», «СКАН-СОЯ», «СКАН-КУКУРУЗА» выпускаются в двух форматах:

-формат FLASH, предусматривающий детекцию результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора «ДЖИН» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»);

-формат Real-time, предусматривающий детекцию результатов ПЦР в ходе амплификации с использованием детектирующего амплификатора «ДТ-322» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»).

5.2.3. Тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ», «КВАНТУМ-П КУКУРУЗА» включают (на 50 образцов):

- смесь для амплификации, запечатанную парафином, по 20 мкл 150 пробирок;
- раствор Taq-полимеразы, по 500 мкл 3 пробирки;
- минеральное масло, по 1,0 мл 3 пробирки;
- положительный контрольный образец ДНК, 100 мкл 1 пробирка;
- калибровочные стандартные образцы (5%, 1% и 0,1%), по 100 мкл 3 пробирки.

5.2.4. Раствор физиологический (0,9% NaCl) стерильный.

6. Отбор, хранение и подготовка образцов пищевых продуктов для анализа

Отбор проб проводят в соответствии с методическими документами, устанавливающими порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-2000, 10852-86, 13979.0-86, 26313-84, 26312.1-84, 9792-73, 7631-85.

6.1. Отбор образцов продуктов

6.1.1. От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:

-от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5-10 г.) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50-100 г);

-из общей пробы отбирают среднюю пробу массой 10-20 г, помещают в полиэтиленовый пакет, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

6.1.2. От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу массой 10-50 г. в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

6.1.3. Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл, который, в свою очередь, дополнительно помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет, печатают и отправляют на анализ.

6.2. Подготовка образцов продуктов к анализу

6.2.1. Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, ступки и пестики, предварительно обработанные хромовой смесью и фламбированные инструменты - пинцеты, скальпели, ножницы.

6.2.2. Пробы сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 5-10 г и растирают пестиком до гомогенного состояния. Для анализа необходимо 50 – 150 мкг образца.

6.2.3. Пробы плотных продуктов (сырых или подвергшихся кулинарной обработке) весом 5-10 г помещают в ступку, измельчают ножницами, затем растирают пестиком до гомогенного состояния. Для анализа необходимо 50 – 150 мкг образца.

6.2.4. Пробы продуктов консистенции крахмала массой 100-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки и добавляют 1,0 мл физиологического раствора. Для анализа необходимо 50 – 150 мкл образца.

6.2.5. Пробы жидкой консистенции отбирают автоматическими пипетками с одноразовыми наконечниками в одноразовые пробирки из полипропилена. Для анализа необходимо 50 - 150 мкл образца.

6.3.Хранение и транспортирование проб

6.3.1. Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания.

6.3.2. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре минус 20°C) в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа).

6.3.3. Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

7. Порядок проведения исследования

7.1. Выделение ДНК из образцов пищевых продуктов и продовольственного сырья с помощью комплекта реагентов «ПРОБА-ЦТАБ»

Внимание! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец. Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, промаркированную «К-», внести 50 мкл физиологического раствора стерильного. Далее проводить пробоподготовку в пробирке «К-», не содержащей анализируемого материала, в соответствии с инструкцией.

7.1.1. Приготовить буфер для выделения (на 10 образцов): добавить в пробирку со смесью №1 2,5мл раствора №2, встряхнуть на вортексе до полного растворения содержимого пробирки. Добавить 2,5мл раствора №3 и 1мл раствора №4. Перемешать на вортексе.

ВНИМАНИЕ! Готовый буфер для выделения не подлежит хранению, его необходимо использовать в течении часа после приготовления!

7.1.2. В пластиковую пробирку емкостью 1.5мл, содержащую 20-30 мг анализируемого материала, добавить 500 мкл буфера для выделения. Тщательно гомогенизировать образец и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.

7.1.3. Термостатировать пробирку в течение 5 мин при 65°C.

- 7.1.4. Добавить 500 мкл раствора №5 и тщательно встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5сек.
- 7.1.5. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.
- 7.1.6. Аккуратно перенести верхнюю фазу в чистую пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 7.1.7. Добавить 750 мкл раствора №6 и перемешать, 2-3 раза аккуратно перевернув пробирку.
- 7.1.8. Центрифугировать пробирку 10 мин при 13000 об/мин.
- 7.1.9. Удалите надосадочную жидкость.
- 7.1.10. Добавить 1 мл раствора №7 и несколько раз перевернуть пробирку.
- 7.1.11. Центрифугировать пробирку 5 мин при 13000 об/мин.
- 7.1.12. Удалить надосадочную жидкость.
- 7.1.13. Подсушить осадок термостатированием пробирки с открытой крышкой в течение 5 мин при 65°C.
- 7.1.14. Добавить 100 мкл раствора №8.
- 7.1.15. Термостатировать пробирку 15 мин при 65°C, периодически встряхивая пробирку.

Полученный препарат ДНК хранить при -20°C в течение 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Для использования в ПЦР препарат ДНК необходимо развести в 10 раз раствором №8.

Примечание В растворе №3 допускается выпадение осадка. Перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона в течение 10-15 мин при 65°C.

7.2. Качественное определение ГМО

Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции:

- 7.2.1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца - «К-», для положительного контрольного образца - «К+». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «Flash») промаркировать дополнительно две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.
- 7.2.2. Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 7.2.3. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.
- 7.2.4. Пробирки перенести в рабочую зону, предназначенную для выделения ДНК из биологического материала.

7.2.5. Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

7.2.6. В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.1), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.2.7. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 сек.

7.2.8. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном в таблицах 1 и 2, с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 1

Формат «Flash»
Режим амплификации для амплификатора «Терцик»
Алгоритм регулирования: «точный»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	94 °С	1 мин 30 сек	1
2.	94 °С	20 сек	5
	64 °С 67 °С	5 сек 5 сек	
3.	94 °С	1 сек	40
	64 °С	5 сек	
	67 °С	5 сек	
4.	10 °С	Хранение	

Таблица 2

Формат «Real-time»
Режим амплификации для детектирующего амплификатора «ДТ-322»

№№ п.п.	Температура	Время	Количество циклов
1.	80 °С 94 °С	30 сек 1 мин 30 сек	1
2.	94 °С 64 °С*	30 сек 15сек	5
3.	94 °С 64 °С*	10 сек 15 сек	45
4.	10 °С	Хранение	

*-регистрация результатов

Регистрация результатов амплификации

7.2.9. Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора: после прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контрольного образца - 2,50).

7.2.10. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322: регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

Учет результатов реакции с помощью ПЦР-детектора и детектирующего амплификатора

7.2.11. Учет и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

7.2.12. В образцах, содержащих ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учет не принимается.

7.2.13. В образцах, не содержащих ДНК промотора 35S и не содержащих ДНК терминатора NOS, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

7.2.14. В случае отрицательного результата на наличие ДНК промотора 35S, терминатора NOS и отрицательного результата амплификации внутреннего

контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из исследуемого материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие биологического материала.

7.2.15. При учёте результатов с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфики (наличие ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учет не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

7.2.16. При получении положительного результата на наличие ДНК промотора 35S и/или терминатора NOS для отрицательного контрольного образца «К-», результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

7.3. Количественное определение ГМО (на примере тест-системы «КВАНТУМ-П СОЯ»)

Создание протокола проведения полимеразной цепной реакции

7.3.1. Создать тест (или выбрать ранее созданный тест) «ГМИ количественный» со следующими параметрами:

- тип проводимого анализа «ГМИ», метод «геометрический (Ср)»;
- типы пробирок: образец, стандарт, контроль+, контроль-
- количество стандартов -3, дублей -2;
- количество копий для стандарта 1 указать «0,1»; для стандарта 2 указать «1»; для стандарта 3 указать «5»;
- положительных (К+) и отрицательных (К-) контролей – по 2;
- объем рабочей смеси в пробирке- 35мкл;
- флуорофоры: FAM-специфика, HEX- ВК
- программа амплификации- указанная таблице 3

Таблица 3

Режим амплификации для детектирующего амплификатора «ДТ-322»

№№	Температура	Время	Количество
----	-------------	-------	------------

п.п.			повторов
1.	80°C	2 мин	1
2.	94°C	1 мин 30 сек	1
3.	94°C 62°C * 67°C	10 сек 20 сек 20 сек	50
4.	10°C	Хранение	-

*-регистрация результатов

7.3.2. Создать протокол амплификации, для чего:

- в окне «протокол» выбрать опцию «добавить тест», в появившемся окне выбрать тест «ГМИ количественный» (см. пункт 7.3.1);
- указать количество исследуемых образцов (количество дублей -2).

Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.3.3. Промаркировать в соответствии с созданным протоколом амплификации необходимое количество пробирок с запечатанной парафином реакционной смесью.

7.3.4. В промаркированные пробирки добавить по 10 мкл тщательно перемешанного на вортексе раствора Таq-полимеразы.

7.3.5. В промаркированные пробирки добавить по 20 мкл минерального масла (приблизительно 1 капля из наконечника на 200 мкл).

7.3.6. Пробирки плотно закрыть и перенести в помещение, предназначенное для пробоподготовки.

7.3.7. В пробирки соответствующие обозначенным в протоколе амплификации «стандарт 1» внести 5мкл калибровочного стандарта ГМ СОЯ 0,1%; в пробирки «стандарт 2» - 5мкл калибровочного стандарта ГМ СОЯ 1%; в пробирки «стандарт 3» - 5мкл калибровочного стандарта ГМ СОЯ 5%.

7.3.8. Внести в соответствующие пробирки по 5 мкл исследуемого образца ДНК.

7.3.9. В пробирки, соответствующие «К-», внести 5 мкл отрицательного контрольного образца (см. пункт 7.1); в пробирки, соответствующие К+, внести 5 мкл положительного контрольного образца (К+ КВАНТУМ-II СОЯ).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК в амплификационную смесь наконечниками с аэрозольными барьерами.

7.3.10. Осадить капли со стенок пробирок центрифугированием на вортексе в течение 2-3 сек.

7.3.11. Пробирки установить в соответствующие лунки амплификатора, выбрав опцию «применить» перейти в окно «запуск программы

амплификации» запустить программу амплификации выбрать директорию для сохранения результатов амплификации.

Анализ результатов полимеразной цепной реакции

7.3.12. Регистрация и учет результатов амплификации проводится автоматически во время амплификации с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором ДТ-322.

7.3.13. Анализ результатов производится автоматически после окончания программы амплификации.

7.3.14. В столбце % ГМО для каждого образца отражаются результаты анализа в виде процентного содержания ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои. Линейный диапазон измерений составляет от 0,1% до 5% ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои. Если результат больше, чем 5%, то он трактуется как *содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои более 5%*. Если результат меньше, чем 0,1%, то он трактуется как *содержание ДНК промотора 35S относительно геномной ДНК сои менее 0,1%*. (рис 1).

7.3.15. Появление любого значения Ср в канале FAM или HEX для отрицательного контрольного образца свидетельствует о наличии контаминации. В этом случае результаты всей постановки бракуют; следует провести мероприятия по устранению контаминации.

Рисунок 1. Пример количественного определения ГМО с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»)

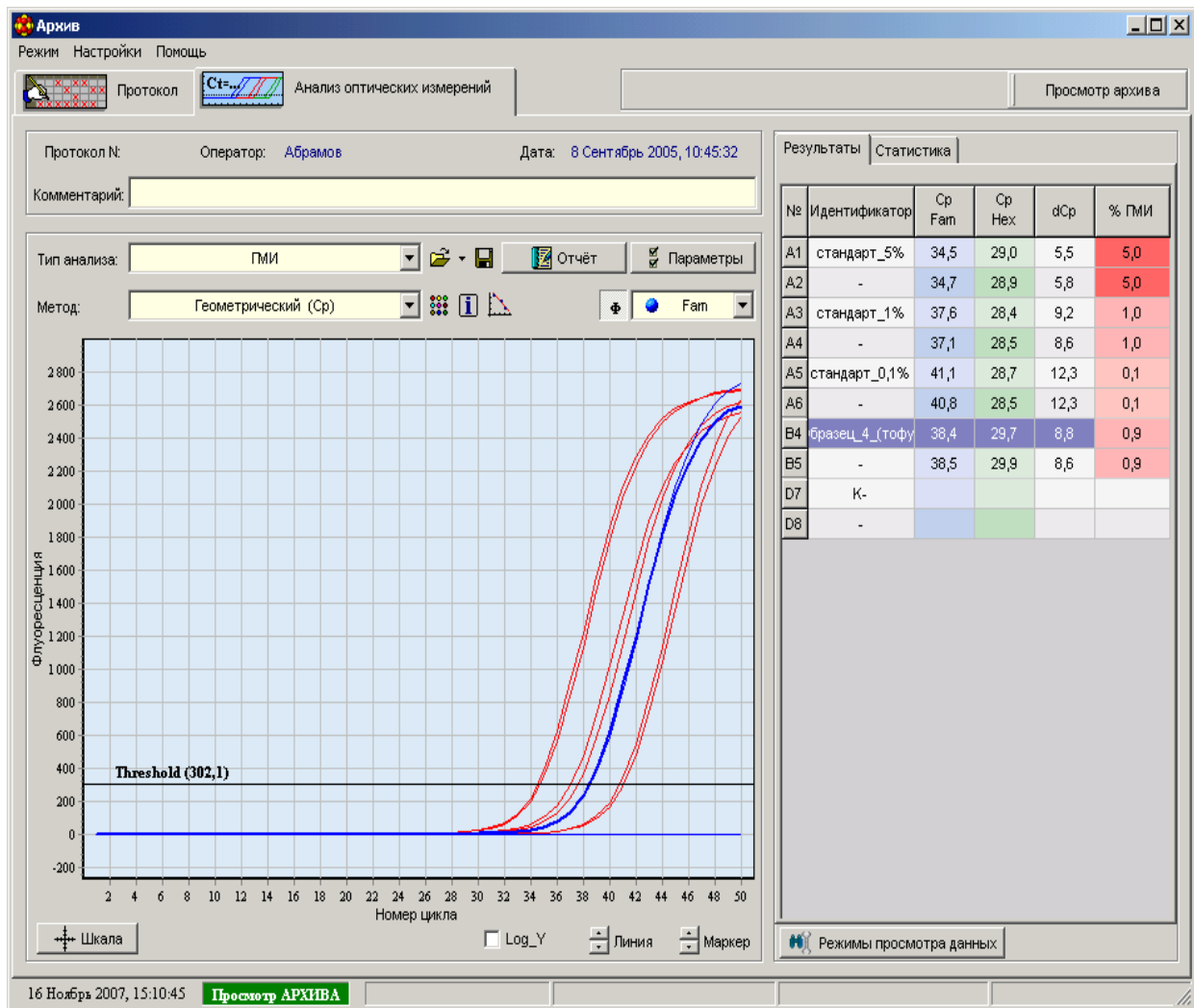


Схема качественного и количественного определения ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье с использованием тест-систем производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология».

