

Качественное и количественное определение генетически
модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в
продуктах питания и пищевом сырье тест-системами производства ЗАО
«Синтол»

Методические рекомендации

Издание официальное

Москва 2006

Качественное и количественное определение генетически
модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в
продуктах питания и пищевом сырье тест-системами производства ЗАО
«Синтол»

Методические рекомендации

Москва 2006

1. Разработаны: ЗАО «Синтол» (Кузубов А.В., Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Боровская С.В.) при участии ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Брагина И.В., Зароченцев М.В., Воронцова Т.В., Потапова Т.Н., Авдеенко Т.Ф.) и ГУ НИИ питания РАМН (Сорокина Е.Ю., Чернышова О.Н.).
2. Утверждены и введены в действие Главным врачом ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, председателем Лабораторного совета Федеральной службы по надзору в службе 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.....	9
	4.1. Общие требования.....	9
	4.2. Требования к персоналу.....	9
	4.3. Правила работы для персонала.....	9
	4.4. Правила работы с оборудованием.....	10
5.	Оборудование, материалы и реактивы.....	10
	5.1. Оборудование.....	10
	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.....	13
7.	Порядок проведения исследования.....	14
	7.1. Выделение ДНК из образцов продуктов.....	14
	7.2. Качественное определение ГМО	15
	7.3. Количественное определение ГМО	18
8.	Интерпретация результатов анализа.....	21
	8.1. Качественное определение ГМО	21
	8.2. Количественное определение ГМО	22
9.	Утилизация отходов.....	24
10.	Источники появления ложноположительных сигналов при проведении ПЦР диагностики и их предотвращение.....	24
	Приложение 1. Схема лабораторного исследования образца пищевой продукции (в соответствии с МУ 2.3.2 1917-04).....	25
	Приложение 2. Схема проведения анализа с помощью тест-систем производства ЗАО «Синтол».....	26

УТВЕРЖДАЮ

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



А.И. Верещагин
2006 г.

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

Методические рекомендации

1. Общие положения и область применения

- 1.1. Настоящие методические рекомендации разработаны для выявления генетически модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и продовольственном сырье (скрининговый анализ на основе выявления 35S-промотора, NOS-терминатора) и количественного определения генетически модифицированной сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2 и генетически модифицированной кукурузы линии MON 810 тест-системами производства ЗАО «Синтол».
- 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

заклучений, 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, гигиенической экспертизы, государственной регистрации, закупки, ввоза в Российскую Федерацию и реализации.

2. Нормативные ссылки

- 2.1. Федеральный закон от 30.03.1999г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
- 2.2. Федеральный закон от 9.01.1996г. № 2-ФЗ «О внесении изменений и дополнений в Закон Российской Федерации «О защите прав потребителей» и Кодекс РСФСР об административных правонарушениях».
- 2.3. Федеральный закон от 2.01.2000г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».
- 2.4. Федеральный закон от 5.06.1996г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».
- 2.5. Федеральный закон от 21.06.2000г. № 96-ФЗ «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».
- 2.6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 6.04.1999г. № 7 «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».
- 2.7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16.09.2003г. № 149 «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов».
- 2.8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 8.11.2000г. № 14 «О порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».
- 2.9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31.12.2004г. № 13 «Об усилении надзора за пищевыми продуктами, полученными из генетически модифицированных источников».
- 2.10. Приказ МЗ РФ от 15.08.2001 г. №325 (ред.от 18.03.200 2 г.) «О санитарно-эпидемиологической экспертизе продукции» (зарегистрированным в МЮ РФ 19.10.2001 г. №2978).

- 2.11. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПин 2.3.2. 1078-01.
- 2.12. Методические указания «Организация работы лабораторий, проводящих исследования с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности методом полимеразной цепной реакции». МУ 1.3.1888-04.
- 2.13. Методические указания «Определение генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции». МУК 4.2.1902-04.
- 2.14. Методические указания «Методы количественного определения генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в продуктах питания». МУК 4.2.1913-04.
- 2.15. ГОСТ Р 52173-2003. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения.

3. Сущность метода

Метод выявления ГМО в сырье и пищевых продуктах растительного происхождения с помощью тест-систем производства ЗАО «Синтол» основан на использовании полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени.

Метод ПЦР в реальном времени основан на детектировании сигнала флуоресценции, позволяющем наблюдать процесс накопления продукта в процессе реакции. Сигнал флуоресценции нарастает пропорционально увеличению количества продукта амплификации в исследуемом образце. Момент заметного увеличения сигнала и отрыв его от базовой линии, так называемый пороговый цикл, зависит от исходного количества ДНК-мишени. Чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл.

3.1. Качественное определение ГМО

Качественное определение ГМО основано на идентификации генетически модифицированных (ГМ) регуляторных последовательностей 35S-промотора и NOS-терминатора. «Тест-система для обнаружения ДНК ГМО (35S-промотор, NOS-терминатор)» ЗАО «Синтол» применяется при скрининговых исследованиях пищевой продукции, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего ГМ аналоги (приложение 1).

При использовании данной тест-системы одновременно в одной пробирке проходит **три независимых реакции**. Одна реакция позволяет обнаружить фрагмент ДНК **35S промотора** вируса мозаики цветной капусты

(CaMV), который присутствует во всех известных и выращиваемых в промышленных масштабах ГМ растениях. Другая реакция позволяет обнаружить фрагмент ДНК **NOS терминатора T1** плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, который также присутствует во многих промышленно выращиваемых ГМ растениях. Наличие положительной динамики для одной или обеих реакций говорит о наличии в образце ДНК ГМ растения. Третья реакция – реакция внутреннего положительного контроля (**ВПК**) - позволяет исключить ложноотрицательные результаты. Положительная динамика по реакции ВПК, в случае отсутствия положительной динамики по двум другим реакциям, подтверждает отсутствие ДНК ГМ растения в образце. Протекание каждой из трех реакций детектируется с помощью специфического зонда, меченного заданным флуоресцентным красителем. Для обнаружения NOS терминатора используется зонд, меченный красителем **FAM**, для 35S промотора – красителем **ROX**, а для ВПК – красителем **Cy5**.

3.2. Количественное определение ГМО

Количественное определение ГМО растительного происхождения основано на расчёте отношения количества ДНК определенной линии ГМ растения к общему количеству ДНК анализируемого растения, выраженного в процентах.

В каждой тест-системе для количественного определения ГМО одновременно проводятся **две независимые реакции** в одной пробирке. Одна реакция позволяет обнаружить ДНК анализируемого растения (соя, кукуруза и т.п.). Другая реакция позволяет обнаружить последовательность, специфичную для конкретной линии ГМ растения. Протекание каждой реакции детектируется с помощью специфического зонда. Для обнаружения ДНК анализируемого объекта (соя, кукуруза) используется зонд, меченный красителем **R6G**, а для обнаружения генетической вставки – красителем **FAM** или **ROX** в зависимости от типа прибора.

Определение процентного содержания ГМО происходит с использованием калибровочных образцов (КО), которые представляют собой смеси ДНК растения дикого типа (0 % ГМО) и ДНК ГМ линии (100 % ГМО) в определенном процентном соотношении. Разность значений пороговых циклов двух реакций для калибровочных образцов используется для построения калибровочной прямой. С помощью калибровочной прямой рассчитывается процентное содержание ДНК ГМО в анализируемых образцах.

«Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2» предназначена для количественного определения ДНК ГМ сои Roundup Ready™ (Monsanto Inc, линия GTS 40-3-2, устойчивая к глифосату).

«Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ кукурузы MON 810» предназначена для количественного определения ДНК

ГМ кукурузы YieldGard® Corn Borer Corn MON 810 (Monsanto Inc, устойчивая к кукурузному мотыльку).

Тест-системы поставляются в вариантном исполнении в зависимости от модели прибора, используемого в лаборатории заказчика. Вариант исполнения определяется набором светофильтров, имеющихся в приборе.

3.3. Этапы определения ГМО

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

- выделение ДНК из исследуемого образца,
- проведение ПЦР в реальном времени,
- анализ полученных данных с помощью программного обеспечения прибора,
- обработка результатов с помощью программы Excel и документирование.

Схема проведения анализа представлена в приложении 2.

4. Требования к помещениям и техника безопасности

4.1. Общие требования

- 4.1.1. Общее расположение лаборатории, а также ее инфраструктура должны соответствовать Методическим указаниям «Организация работы лабораторий, проводящих исследования с патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности методом полимеразной цепной реакции» МУ 1.3.1888-04.
- 4.1.2. Исследования по идентификации ГМО растительного происхождения могут проводиться на базе лабораторий, проводящих исследования методом ПЦР с патогенными биологическими агентами. В таком случае должно быть предусмотрено лишь разграничение проведения исследований во времени.

4.2. Требования к персоналу

- 4.2.1. Персонал, проводящий качественное и количественное определение ГМО растительного происхождения методом ПЦР-РВ должен пройти соответствующее обучение.

4.3. Правила работы для персонала

- 4.3.1. Для сотрудников лаборатории должна быть предусмотрена спецодежда: медицинский халат, шапочка, перчатки и сменная обувь.
- 4.3.2. На каждом этапе ПЦР исследования необходимо использовать индивидуальный набор соответствующего лабораторного оборудования, расходных материалов и одежды.

- 4.3.3. Одноразовые перчатки подлежат смене при каждой новой операции. Работа без перчаток запрещена.
- 4.3.4. Запрещается перемещать личные вещи, лабораторные журналы, лабораторную одежду и канцелярские принадлежности между зонами лаборатории.

4.4. Правила работы с оборудованием

- 4.4.1. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.
- 4.4.2. Перед началом работы рабочую поверхность столов обрабатывают 70% этиловым спиртом и облучают ультрафиолетовым излучением не менее 10 минут.
- 4.4.3. Для того чтобы избежать аэрозольного загрязнения пипеток, использовать только наконечники с антиаэрозольными барьерами.
- 4.4.4. Во время проведения манипуляций на встряхивателе штативы для наконечников должны быть закрыты крышками.
- 4.4.5. По окончании работ рабочие поверхности, дозаторы, встряхиватель, термостат, центрифугу обрабатывают растворами, вызывающими деградацию ДНК (например, 3% раствором хлорамина, 0.1% раствор ДП-2Т с экспозицией 30 минут, с последующей протиркой влажными тампонами для снятия остатков дезинфицирующего средства) и облучают ультрафиолетовым излучением не менее 10 минут.
- 4.4.6. Пробирки с продуктами ПЦР и использованные наконечники к микродозаторам подвергаются первичной обработке растворами, вызывающими деградацию ДНК.

5. Оборудование, материалы и реактивы

5.1. Оборудование

5.1.1. **ЗОНА 1.** Этап выделения ДНК из исследуемого материала:

- 5.1.1.1. ПЦР-бокс (например, БАВ-ПЦР "Ламинар-С" фирмы «Ламинарные системы», Россия) или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой.
- 5.1.1.2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25-100°C (например, «Циклотемп-501», фирмы СТМ-Ц, Россия).
- 5.1.1.3. Микроцентрифуга для пробирок со скоростью вращения 10000-16000 об./мин. (до 12000 г) (например, «Циклотемп-201», фирмы СТМ-Ц, Россия).
- 5.1.1.4. Микроцентрифуга-встряхиватель со скоростью вращения не менее 3500об./мин. (до 2500 г) и со сменными роторами для пробирок на 1.5 и на 0.2 мл (например, «Циклотемп-901», фирмы СТМ-Ц, Россия).

- 5.1.1.5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема 2-20, 20-200, 100-1000 мкл (например, фирмы «ВЮНИТ», Финляндия).
- 5.1.1.6. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, фирмы «Ахуген», США).
- 5.1.1.7. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки на 1.5 мл типа «Эппендорф» (например, фирмы «Sarstedt», Германия).
- 5.1.1.8. Штативы для микропробирок на 1.5 мл (например, фирмы «Хеликон», Россия).
- 5.1.1.9. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678.
- 5.1.1.10. Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г ГОСТ 24404.
- 5.1.1.11. Пинцеты медицинские ГОСТ 21241-89.
- 5.1.1.12. Ножницы медицинские.
- 5.1.1.13. Скальпели хирургические.
- 5.1.1.14. Ступки фарфоровые с пестиком.

5.1.2. **ЗОНА 2.** Этап амплификации ДНК (метод ПЦР-РВ) и анализ результатов:

- 5.1.2.1. Прибор для ПЦР в реальном времени (например, «АНК-32», ИАиП РАН, Россия).
- 5.1.2.2. ПЦР-бокс или отдельный стол, освещаемый УФ-лампой (например, БАВ-ПЦР "Ламинар-С" фирмы «Ламинарные системы», Россия).
- 5.1.2.3. Микроцентрифуга-встряхиватель со скоростью вращения не менее 3500 об./мин. (до 2500 г) и со сменными роторами для пробирок на 1.5 и на 0.2 мл (например, «Циклотемп-901», фирмы СТМ-Ц, Россия).
- 5.1.2.4. Автоматическая пипетка переменного объема 0.5-10 мкл (например, фирмы «ВЮНИТ», Финляндия).
- 5.1.2.5. Штативы для микропробирок на 0.2 мл (например, фирмы «Хеликон», Россия).
- 5.1.2.6. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл (например, фирмы «Ахуген», США).
- 5.1.2.7. Холодильник с отделениями на 2-8°C и на (-18)-(-20)°C. ГОСТ 26678.

Допускается использование аналогичного оборудования, не уступающего по характеристикам указанному выше.

5.2. Реактивы

- 5.2.1. «Тест-система для обнаружения ДНК ГМО (35S-промотор, NOS-терминатор)» имеет следующий состав:

- «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов» с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромид (СТАВ). Включает деионизованную воду – 1 флакон 20 мл, экстракционный буфер – 1 пробирка 25 мл, протеиназу К – 1 пробирка 0,230 мл, хлороформ – 1 флакон 70 мл, осаждающий буфер А – 1 пробирка 45 мл, солевой раствор – 1 флакон 20 мл, осаждающий буфер Б – 1 пробирка 35 мл, промывочный буфер – 1 пробирка 30 мл, ТЕ буфер – 1 пробирка 5 мл. Все реагенты готовы к использованию. Комплект рассчитан на выделение ДНК из 40 образцов, включая контрольные образцы.
- Комплект «Аmplификация ДНК. 35S-промотор, NOS-терминатор с ВПК» - 96 пробирок, содержащих 0,025 мл готовой ПЦР-смеси, закрытой 0,020 мл минерального масла.
- Положительный контрольный образец ДНК ГМО, с концентрацией фрагмента 35S-промотора и NOS-терминатора менее 100 копий/мкл, 1 пробирка 0,05 мл.

5.2.2. «Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2» имеет следующий состав:

- «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов» (см. п. 5.2.1).
- Комплект «Аmplификация ДНК. ГМ соя GTS 40-3-2» - 96 пробирок, содержащих 0,025 мл готовой ПЦР-смеси, закрытой 0,020 мл минерального масла.
- Калибровочные образцы, содержащие 0.5%, 1%, 2% и 5% ГМ сои GTS 40-3-2, 4 пробирки по 0,05 мл.

5.2.3. «Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ кукурузы линии MON 810» имеет следующий состав:

- «Набор реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов» (см. п. 5.2.1).
- Комплект «Аmplификация ДНК. ГМ кукуруза MON 810» - 96 пробирок, содержащих 0,025 мл готовой ПЦР-смеси, закрытой 0,020 мл минерального масла.
- Калибровочные образцы, содержащие 0.5%, 1%, 2% и 5% ГМ кукурузы MON 810, 4 пробирки по 0,05 мл.

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

Отбор проб проводят по государственным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-2000, 10852-86, 12430-66, 13979-86, 26313-84, 22617.0-77, 27668-88, 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 с застежкой-молнией размером не более 10x15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20x30 см, 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 с застежкой-молнией размером не более 10x15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные (выдержанные в 96% этаноле и обожженные в пламени газовой горелки) инструменты, 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, печатают и отправляют на исследование.

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 продуктов

- 7.1.1. Все компоненты «Набора реактивов для выделения ДНК из растительного сырья и пищевых продуктов», за исключением протеиназы К, предварительно довести до комнатной температуры, лизирующий и осаждающий буфер А перемешать плавным переворачиванием до полного растворения осадка.
Примечание: Интенсивное перемешивание приводит к образованию устойчивой пены.
- 7.1.2. Подготовленный в соответствии с разделом 6.2 образец перенести в одноразовую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл или 2.0 мл. В пробирку отрицательно контроля выделения ДНК ничего не вносить.
- 7.1.3. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку по 300 мкл деионизированной воды. Тщательно перемешать смесь на встряхивателе или с помощью стеклянной палочки.
- 7.1.4. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку по 500 мкл экстракционного буфера и 5 мкл протеиназы К. Тщательно перемешать смесь на встряхивателе или с помощью стеклянной палочки.
Примечание: Протеиназу К следует доставать из холодильника непосредственно перед использованием и убирать обратно в холодильник сразу после использования.
- 7.1.5. Инкубировать смесь 60 минут при температуре +56°C, периодически перемешивая на встряхивателе. Остудить пробирку до комнатной температуры и центрифугировать смесь при 16000 об./мин. (10000-12000 g) в течение 10 минут.
- 7.1.6. Надосадочную жидкость в объеме 300-500 мкл очень аккуратно, не захватывая осадок и капли жира, перенести отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами в новые пробирки.

- Добавить 500 мкл хлороформа. Интенсивно перемешать на встряхивателе в течение как минимум 30 секунд. Центрифугировать суспензию при 16000 об./мин. (10000-12000 g) в течение 10 минут.
- 7.1.7. Верхнюю фазу очень аккуратно, не захватывая слой хлороформа и межфазный слой, перенести отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами в новые пробирки. Добавить 500 мкл хлороформа. Интенсивно перемешать на встряхивателе в течение как минимум 30 секунд. Центрифугировать суспензию при 16000 об./мин. (10000-16000 g) в течение 5 минут.
- 7.1.8. Верхнюю фазу очень аккуратно, не захватывая слой хлороформа и межфазный слой, перенести отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами в новые пробирки. Добавить в каждую пробирку двойной объем осаждающего буфера А. Перемешать смесь, плавно переворачивая пробирку.
Примечание: Интенсивное перемешивание приводит к образованию устойчивой пены.
- 7.1.9. Инкубировать смесь 60 минут при комнатной температуре. Центрифугировать при 16000 об./мин. (10000-12000 g) в течение 5 минут.
- 7.1.10. Осторожно удалить надосадочную жидкость. Следить, чтобы осадок остался в пробирке. Осадок растворить в 350 мкл солевого раствора. Для лучшего растворения осадка смесь можно прогреть при +56°C в течение нескольких минут.
- 7.1.11. После полного растворения осадка добавить 350 мкл хлороформа. Интенсивно перемешать на встряхивателе в течение как минимум 30 секунд. Центрифугировать суспензию при 16000 об./мин. (10000-12000 g) в течение 5 минут.
- 7.1.12. Верхнюю фазу очень аккуратно, не захватывая слой хлороформа и межфазный слой, перенести отдельными наконечниками с аэрозольными барьерами в новые пробирки. Добавить двойной объем осаждающего буфера Б, перемешать, плавно переворачивая пробирку. Центрифугировать при 16000 об./мин. (10000-12000 g) в течение 10 минут.
- 7.1.13. Осторожно удалить надосадочную жидкость. К осадку прибавить 500 мкл промывочного буфера. Перемешать на встряхивателе при средних оборотах, не разрушая осадка. Центрифугировать при 16000 об./мин. (10000-12000 g) в течение 10 минут.
- 7.1.14. Надосадочную жидкость тщательно удалить. Оставить пробирки с открытыми крышками до полного испарения жидкости.
- 7.1.15. Сухой осадок растворить в 100 мкл ТЕ-буфера. Раствор ДНК рекомендуется хранить при -20°C.

7.2. Качественное определение ГМО

Реактивы поставляются в готовом виде в пробирках для ПЦР объемом 0,2 мл и требуют только внесения образца ДНК.

- 7.2.1. Взять необходимое количество пробирок с реакционной смесью из «Тест-системы для обнаружения ДНК ГМО (35S-промотор, NOS-терминатор)» из расчета $2 \cdot N + 4$, где N- количество анализируемых образцов. Не допускать размораживания и повторного замораживания оставшихся пробирок со смесью.
- 7.2.2. После размораживания реакционной смеси, центрифугировать пробирки 30-60 секунд (скорость вращения ротора более 4000 об./мин. или 2500g). Для этого воспользоваться либо ротором для пробирок 0.2 мл, либо адаптерами к стандартному ротору для пробирок 2.0 мл.
- 7.2.3. Маркировать пробирки. Для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку наносить на стенку пробирки; для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку.
- 7.2.4. Положительный контрольный образец (ПКО) ДНК ГМО, отрицательный контроль выделения (ОКО) и исследуемые образцы разморозить, перемешать на встряхивателе и центрифугировать.
- 7.2.5. Внести в пробирки с реакционной смесью под масло по 2 мкл отрицательного контроля выделения, исследуемых образцов и, в последнюю очередь, положительного контрольного образца ДНК ГМ растения в двух повторах, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать многократным пипетированием (5-10 раз) и плотно закрыть крышку. Следить, чтобы в смеси не оставалось пузырьков воздуха. При образовании пузырьков центрифугировать пробирки 3-5 сек.
- 7.2.6. Поместить пробирки в амплификатор в порядке, приведенном в таблице 1.

Таблица 1. Порядок исследования образцов при проведении качественного анализа

<i>№ лунки</i>	<i>Тип образца</i>
1	ПКО
2	ПКО
3	ОКО
4	ОКО
5	исследуемый образец 1
6	исследуемый образец 1
7	исследуемый образец 2
8	исследуемый образец 2
9	исследуемый образец 3
10	исследуемый образец 3
...	...

- 7.2.7. Задать программу амплификации (табл. 2), выбрать соответствующие каналы детекции (табл. 3) и запустить прибор в соответствии с инструкцией.

Таблица 2. Программа амплификации.

<i>№ ступени</i>	<i>Температура</i>	<i>Время</i>	<i>Кол-во циклов</i>	<i>Оптика</i>
1	95°C	10 минут	1	
2	95°C	20 секунд	50	
	60°C	50 секунд		включена
3	25°C	Хранение		

Таблица 3. Каналы детекции.

<i>Реакция</i>	<i>Краситель</i>	<i>Длина волны поглощения/испускания</i>	<i>Подходящие для измерения каналы прибора</i>
NOS-терминатор	FAM	494 / 518	FAM, SYBR Green I
35S-промотор	ROX	580 / 605	ROX, Tx. Red
ВПК	Cy5	635 / 670	Cy5

- 7.2.8. После окончания реакции отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.
- 7.2.9. С помощью программного обеспечения прибора для ПЦР-РВ произвести расчет и сохранение значений пороговых циклов C_t кинетических кривых проведенной реакции для трех красителей – FAM (NOS-терминатор), ROX (35S-промотор) и Cy5 (ВПК).
- 7.2.10. Скопировать рассчитанные значения C_t в шаблон файла для автоматического анализа результатов в программе Excel (табл. 4). При необходимости распечатать.

Таблица 4. Файл автоматического анализа результатов качественного определения ГМО.

Обнаружение ГМО							
дата	дд.мм.гг						
файл	nn.nn.nn.nn						
№	Название	NOS	35S	ВПК	Ct (FAM)	Ct (ROX)	Ct (Cy5)
1	ПКО	33,02	34,75		33,69	35,06	>50,00

2	ПКО				32,35	34,44	>50,00
3	ОКО	-	-	31,15	>50,00	>50,00	30,75
4	ОКО	-	-		>50,00	>50,00	31,56
5	ОБРАЗЕЦ 1	+	+	+	28,43	30,14	30,98
6	1	+	+	+	28,47	30,5	30,45
7	ОБРАЗЕЦ 2	+	+	-	28,69	30,93	>50,00
8	2	+	+	-	28,84	31,27	>50,00
9	ОБРАЗЕЦ 3	+	-	+	28,43	>50,00	29,85
10	3	+	-	+	28,47	>50,00	29,79
11	ОБРАЗЕЦ 4	+	-	-	28,43	>50,00	>50,00
12	4	+	-	-	28,47	>50,00	>50,00
13	ОБРАЗЕЦ 5	-	-	+	>50,00	>50,00	29,85
14	5	-	-	+	>50,00	40,19	29,79
15	ОБРАЗЕЦ 6	-	-	-	37,97	39,67	>50,00
16	6	-	-	-	>50,00	>50,00	>50,00

7.3. Количественное определение ГМО

Реактивы поставляются в готовом виде в пробирках для ПЦР объемом 0,2 мл и требуют только внесения образца ДНК.

- 7.3.1. Взять необходимое количество пробирок с реакционной смесью из тест-систем для количественного анализа ГМО («Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ сои Roundup Ready линии GTS 40-3-2» или «Тест-система для определения процентного содержания ДНК ГМ кукурузы MON 810») из расчета $2 \cdot N + 8$, где N – количество анализируемых образцов. Не допускать размораживания и повторного замораживания оставшихся пробирок со смесью.
- 7.3.2. После размораживания реакционной смеси, центрифугировать пробирки 30-60 секунд (скорость вращения ротора более 4000 об./мин. или 2500g). Для этого воспользоваться либо ротором для пробирок 0.2 мл, либо адаптерами к стандартному ротору для пробирок 2.0 мл.
- 7.3.3. Маркировать пробирки. Для приборов, производящих измерение через крышку пробирки, маркировку наносить на стенку пробирки; для приборов, производящих измерение через стенку пробирки – на крышку.
- 7.3.4. Калибровочные образцы (КО) ДНК ГМО и исследуемые образцы разморозить, перемешать на встряхивателе и центрифугировать.
- 7.3.5. Внести в пробирки под масло по 2 мкл исследуемых образцов и, в последнюю очередь, калибровочных образцов ГМ сои или кукурузы в двух повторах, используя наконечники с аэрозольным барьером, перемешать многократным пипетированием (5-10 раз) и плотно закрыть крышку. Следить, чтобы в смеси не оставалось пузырьков

воздуха. При образовании пузырьков центрифугировать пробирки 3-5 сек.

- 7.3.6. Поместить пробирки в амплификатор в порядке, приведенном в табл. 5.

Таблица 5. Порядок следования образцов при количественном анализе.

<i>№ лунки</i>	<i>Тип образца</i>
1	КО 0,5 %
2	КО 0,5 %
3	КО 1 %
4	КО 1 %
5	КО 2 %
6	КО 2 %
7	КО 5 %
8	КО 5 %
9	исследуемый образец 1
10	исследуемый образец 1
11	исследуемый образец 2
12	исследуемый образец 2
13	исследуемый образец 3
14	исследуемый образец 3
...	...

- 7.3.7. Задать программу амплификации (табл. 6 и 7), выбрать соответствующие каналы детекции (табл. 8) и запустить прибор в соответствии с инструкцией.

Таблица 6. Программа амплификации для количественного анализа ГМ сои GTS 40-3-2.

<i>№ цикла</i>	<i>Температура</i>	<i>Время</i>	<i>Кол-во циклов</i>	<i>Оптика</i>
1	95°C	10 минут	1	
2	95°C	20 секунд	50	включена
	62°C	50 секунд		
3	25°C	Хранение		

Таблица 7. Программа амплификации для количественного анализа ГМ кукурузы MON 810.

<i>№</i>	<i>Температура</i>	<i>Время</i>	<i>Кол-во</i>	<i>Оптика</i>
----------	--------------------	--------------	---------------	---------------

<i>ступени</i>			<i>циклов</i>	
1	95°C	10 минут	1	
2	95°C	20 секунд	50	
	60°C	50 секунд		включена
3	25°C	Хранение		

Таблица 8. Каналы детекции.

<i>Реакция</i>	<i>Краситель</i>	<i>Длина волны поглощения/испускания</i>	<i>Подходящие для измерения каналы прибора</i>
Соя / кукуруза	R6G	520 / 550	R6G, JOE, HEX, TET
ГМ вставка	FAM или ROX	490 / 520	FAM, SYBR Green I
		580 / 605	ROX, Tx. Red

- 7.3.8. После окончания реакции отработанные пробирки утилизировать в соответствии с рекомендациями по организации ПЦР лаборатории.
- 7.3.9. С помощью программного обеспечения прибора для ПЦР-РВ произвести расчет и сохранение значений пороговых циклов C_t кинетических кривых проведенной реакции для двух красителей – R6G (ДНК сои или кукурузы) и FAM/ROX, в зависимости от типа прибора (ГМ вставка).
- 7.3.10. Скопировать рассчитанные значения C_t в шаблон файла для автоматического анализа результатов в программе Excel (рис. 1). При необходимости распечатать.

Рис.1. Файл автоматического анализа результатов количественного определения ГМ сои.

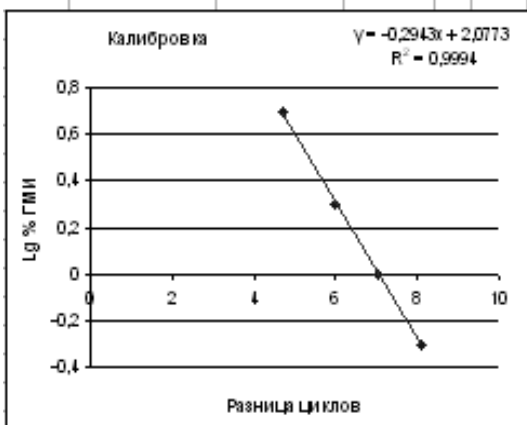
Определение процентного содержания ГМ сои Roundup Ready

№	Название	% ГМИ	ст откл	% Ig	% Ct (R6G)	Ct (ROX)	Разн	Сред	Примечания	
1	КО 0.5%			0,5	-0,3	25,49	33,68	8,19	8,105	
2	КО 0.5%			0,5	-0,3	25,34	33,36	8,02		
3	КО 1%			1	0	25,37	32,37	7	7,05	
4	КО 1%			1	0	25,43	32,53	7,1		
5	КО 2%			2	0,3	25,59	31,61	6,02	5,99	
6	КО 2%			2	0,3	25,85	31,81	5,96		
7	КО 5%			5	0,7	25,64	30,36	4,72	4,715	
8	КО 5%			5	0,7	25,45	30,16	4,71		
9	ОБРАЗЕЦ 1	77,00	5,16	73	1,9	21,45	22,17	0,72		
10	Соя 1			81	1,9	21,66	22,24	0,58		
11	ОБРАЗЕЦ 2	0,00	0,00	0	-292	23,98	>50,00	1000		
12	Соя 2			0	-292	24,06	>50,00	1000		
13	ОБРАЗЕЦ 3	0,96	0,00	1	-0	22,11	29,23	7,12		
14	Соя 3			1	-0	22,31	29,42	7,11		
15	ОБРАЗЕЦ 4	0,00	0,00	0	-292	>50,00	>50,00	1000		!!! Соя в образце не обн
16	Кукуруза 1			0	-292	>50,00	>50,00	1000		!!! Соя в образце не обн

Уравнение калибровочной прямой $y = Ax + B$

A = -0,2943

B = 2,0773



8. Интерпретация результатов

8.1. Качественное определение ГМО

8.1.1. Результатом эксперимента является качественное выявление ДНК ГМО в ПКО, ОКО и исследуемых образцах (табл.4).

8.1.2. **Критерием достоверности** полученных результатов является выполнение ВСЕХ ниже перечисленных условий:

- пороговый цикл (C_t FAM) для ПКО NOS-терминатора < 37 ;
- пороговый цикл (C_t ROX) для ПКО 35S-промотора < 37 ;
- результат определения ОКО отрицательный, пороговый цикл (C_t Су5) для внутреннего положительного контроля в ОКО < 37 .

- 8.1.3. В случае обнаружения ГМО в ОКО результат анализа всех проб нельзя считать достоверным. Требуется предпринять меры по выявлению источника контаминации и повторить анализ проб.
- 8.1.4. Определение ДНК 35S-промотора и NOS-терминатора в исследуемых образцах проводится автоматически путем сравнения исследуемых образцов и ПКО, в котором содержится менее 100 копий/мкл ДНК 35S-промотора и NOS-терминатора.
- 8.1.5. Интерпретацию результатов анализа следует проводить в соответствии с таблицей 9.

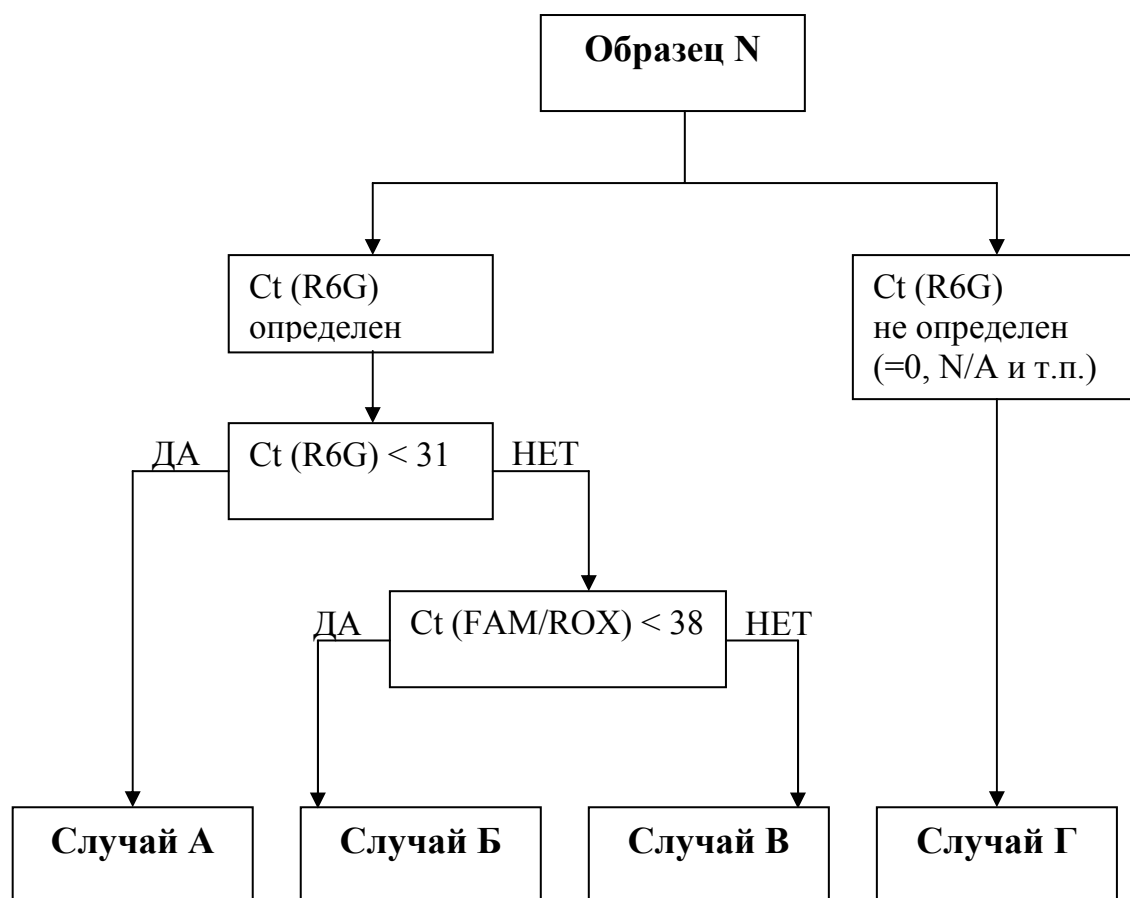
Таблица 9. Интерпретация результатов анализа

<i>Результат ПЦР по</i>			<i>Интерпретация</i>
<i>NOS</i>	<i>35S</i>	<i>ВПК</i>	
+	-	+	Обнаружен NOS-терминатор
+	-	-	
-	+	+	Обнаружен 35S-промотор
-	+	-	
+	+	+	Обнаружен 35S-промотор и NOS-терминатор
+	+	-	
-	-	+	Не обнаружены 35S-промотор и NOS-терминатор
-	-	-	Ложноотрицательный результат, в образце присутствуют ингибиторы ПЦР. Рекомендуется развести образец в 5 раз ТЕ-буфером (Реактив №9 из набора для выделения ДНК) и повторить определение. Для количественного исследования такого образца также рекомендуется брать разбавленную ДНК.

8.2. Количественное определение ГМО

- 8.2.1. Результатом эксперимента является построение калибровочной прямой, расчет ее параметров и определение процентного содержания ГМО в исследуемых образцах (рис.1).
- 8.2.2. **Критерием достоверности** построенной калибровочной прямой является выполнение ВСЕХ ниже перечисленных условий:
- коэффициент корреляции R^2 более 0,97 (см. параметры калибровочной прямой на графике);
 - коэффициент A калибровочной прямой лежит в диапазоне от 0,25 до 0,35.

8.2.3. Результаты, полученные для исследуемых образцов, считаются достоверными только в том случае, когда выделилось достаточное для анализа количество ДНК исследуемого растения. Анализ достоверности полученных результатов проводят по схеме:



Случай А: выделилось достаточное количество ДНК для определения любых процентных содержаний ГМО. Результаты расчёта принимаются.

Случай Б: образец содержит недостаточное количество ДНК для точного расчёта процента ГМО. Результаты расчёта считаются приблизительными и принимаются только в случае обнаружения больших содержаний ГМО (> 10%). Для получения более точных данных рекомендуется повторить амплификацию, взяв 5 мкл образца, или выделить ДНК из нескольких навесок образца, объединить и сконцентрировать.

Случай В: образец содержит недостаточное количество ДНК для точного определения процента ГМО. Результаты расчёта считаются недостоверными. Для получения более точных данных рекомендуется повторить амплификацию, взяв 5 мкл образца, или выделить ДНК из нескольких навесок образца, объединить и сконцентрировать.

Случай Г: в образце не обнаружено искомой растительной ДНК.

9. Утилизация отходов

- 9.1. Пробирки после выделения ДНК утилизируются как обычные твердые отходы.
- 9.2. Пробирки с продуктами ПЦР и использованные наконечники к микродозаторам подвергаются первичной обработке растворами, вызывающими деградацию ДНК.

10. Источники появления ложноположительных результатов при проведении ПЦР-анализа и их предотвращение

Наиболее мощные источники загрязнений (в порядке вклада):

- загрязнение продуктами предыдущих реакций;
- загрязнение положительным контролем (клонированная ДНК или сырье);
- перекрестное загрязнение образцов;
- загрязнение из других источников при взятии образцов (возможно даже загрязнение от перчаток).

- 10.1. Для предотвращения появления ложно положительных сигналов необходимо соблюдать требования по организации лаборатории и правила работы персонала с оборудованием и реактивами.
- 10.2. Необходимо предотвращать возможность загрязнений, происходящих вне лаборатории – во время сбора образцов и их первичной обработки (фасовка, упаковка, транспортировка).
- 10.3. На этапах выделения ДНК и постановки ПЦР необходимо постоянно использовать в работе отрицательные контроли.
- 10.4. Для повышения точности анализа исследования должны выполняться не менее, чем в двух повторах (исследовать от одного образца сразу две пробы).
- 10.5. В случае получения постоянных положительных сигналов на отрицательных контролях все исходные реактивы немедленной заменить и провести мероприятия по деконтаминации в соответствии с МУ 1.3.1888-04.

Схема лабораторного исследования образца пищевой продукции
(в соответствии с МУ 2.3.2 1917 – 04).

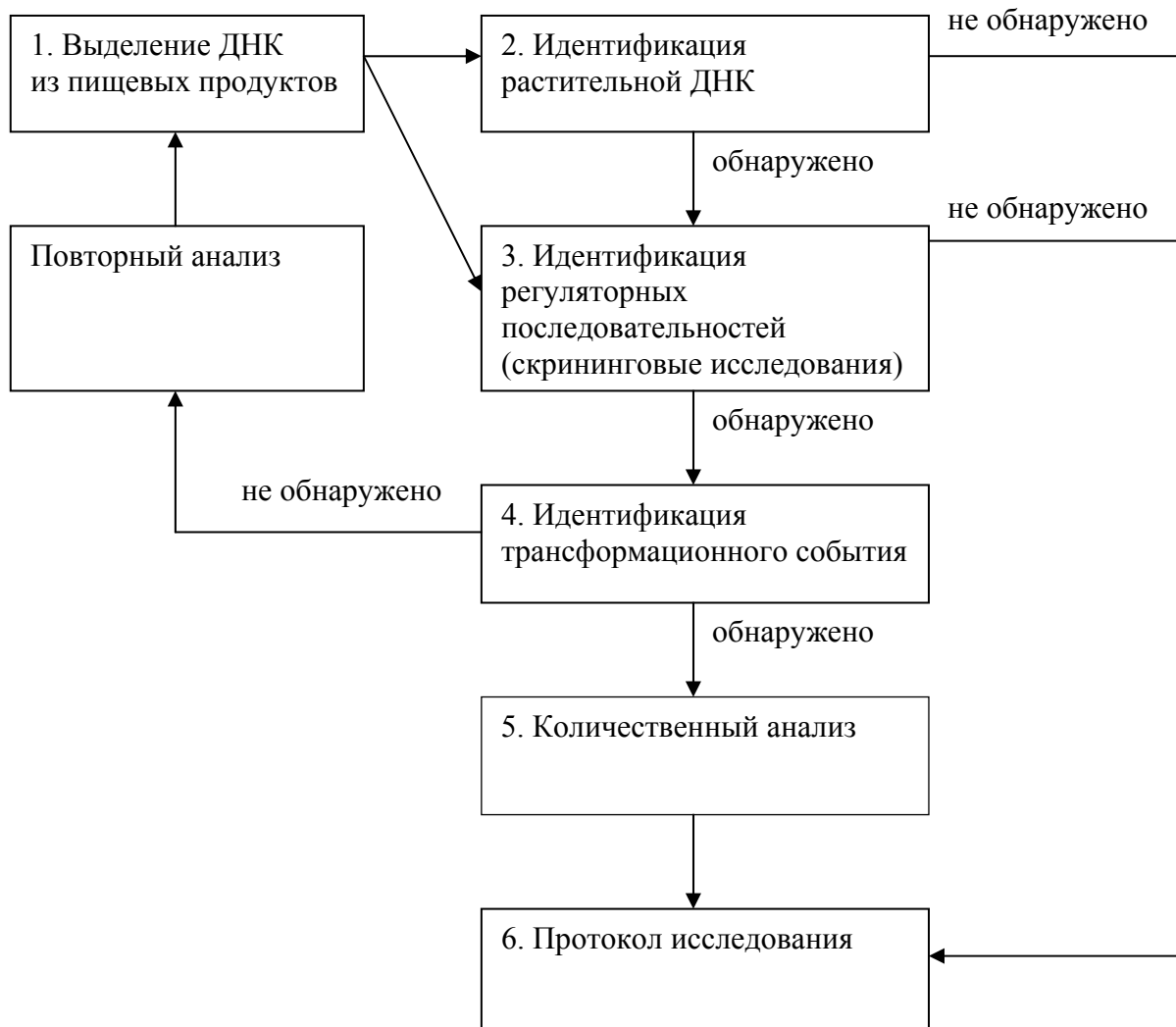


Схема проведения анализа с помощью тест-систем производства ЗАО «Синтол».

