Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ (ГМО) РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУК 4.2. 2008 -05

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

МОСКВА 2005

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2 МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ (ГМО) РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУК 4 2 2008 -05

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

МОСКВА 2005

1. Разработаны: ГУ НИИ питания РАМН (В.А.Тутельян - руководитель, Е.Ю.Сорокина, О Н.Чернышева, Н.А.Кашина), ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзор России (Т.В.Воронцова, Т.Н Потапова); Инновационная корпорация «Биозащита» (И В. Панкин)
2. Рекомендован к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.
3. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г.Г Онищенко 17 октября 2005 г.
4. Введены впервые

Тиражировано отделением издания с редакцией ЗНиСО
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

Тираж 1000 экз.

Содержание

1. Область применения 4
2. Общие положения 5.
3 Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы 5.
4 Подготовка к анализу 7.
5. Отбор и подготовка проб пищевых продуктов для анализа 8
6. Проведение анализа. Выделение ДНК 8.
7. Амплификация 9.
8 Проведение ДНК гибридизации 10
9 Проведение ферментного анализа 10
10. Сканирование биологических микрочипов 11
11. Анализ изображений биочипов 11
12. Интерпретация результатов 11.
13 Организация рабочих мест 12

Приложение 1. Пример гибридизационной картины продуктов амПЦР на биологическом микрочипе 13.

Приложение 2. Форма протокола испытаний по идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе 14.

Нормативные ссылки 15.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации

«17 октября 2005 г.» Г Г Онищенко

Дата введения. с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНО-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ (ГМО) РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ

Методические указания
МУК 4.2. 2008 -05

1. Область применения

1 1 Настоящие методические указания подготовлены для идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов (далее – ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе и его последующей обработки на аппаратно-программном комплексе «ДЕГМИГЕН-001»

1.2 Методические указания разработаны в соответствии с Федеральным законом от 30 03.99 №52-ФЗ (в редакции от 09 05.2005 № 45-ФЗ) «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», Законом Российской Федерации от 07.02.92 № 2300-I (в редакции от 21.12.2004 № 171-ФЗ) «О защите прав потребителей», Постановления Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», Постановления Правительства Российской Федерации от 15.09.2005 № 569 «О Положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации», Постановления

Правительства Российской Федерации от 24.07 2000 № 554 (в редакции от 15.09 2005 № 569) «Об утверждении Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании».

1.3 Методические указания предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сферс защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также других испытательных лабораторий, аккредитованных в порядке, установленном Правительс твом Российской Федерации.

1.4. Методические указания разработаны для одновременного определения в одном лабораторном испытании пяти различных маркеров рекомбинантной ДНК при проведении скрининга с целью выявления ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах, в том числе, в продовольственном сырье.

2. Общие положения

Методические указания содержат описание метода определения ГМО растительного происхождения в пищевых продуктах с помощью набора реагентов для выявления и идентификации ГМО растительного происхождения с применением фермен гного анализа на биологическом микрочипе. Метод основан на идентификации рекомбинантной ДНК с использованием метода асимметричной мультиплексной полимеразной цепной реакции (далее – амПЦР) и последующей гибридизацией продуктов этой амПЦР с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе. Метод одновременно устанавливает наличие или отсутствие в анализируемой пробе не менее пяти различных рекомбинантных последовательностей ДНК: трёх регуляторных (35 S, nos и ocs) и двух селективных (gus, nptII). Идентификация этих последовательностей позволяет проводить предварительную проверку пищевых продуктов на наличие ГМО растительного происхождения. Чувствительность метода не менее 10^{-12} г (1пг) ДНК.

3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы

3.1. Аппаратура и инструменты

3.1.1 Амплификатор ДНК типа "Терцик-мс-2" под микроцентрифужные пробирки вместимостью 0.2, 0.5 см^3 со скоростью нагрева/охлаждения активного элемента не менее 1 5^{0}С/с ТУ 9642-001-4648062-98.

3.1.2. Комплекс аппаратно-программный для анализа биологических микрочипов типа "ДЕГМИГЕН-001" ТУ 9443-001-02699501-2003.

3.1.3 Компьютерная программа "Arra" для анализа изображений, полученных с помощью комплекса " ДЕГМИГЕН-001".

3.1.4. Биологический микрочип с иммобилизованными олигонуклеотидами ТУ 4320-002-71321417-2004 (Приложение 1А).

3.1.5. Термостат суховоздушный типа ТВ3-25 с рабочей температурой 42^{0}С, рабочий диапазон от 20^{0}С до 60^{0}С, точность поддержания температуры ±1^{0}С ТУ42-61961.

3.1.6. Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104-01 2-го класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ±0,0001г

3.1.7. Термостат типа "TERMO 24-15" под пробирки типа Эппендорф вместимостью 0,5 и 1,5 мл, диапазон температур от 15 до 120^{0}С, количество гнёзд – не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры – 0,2^{0}С, разность температур между соседними ячейками – не более 0,5.

3.1.8. Камера морозильная по ГОСТ 26678-85, обеспечивающая температуру минус 20^{0}С.

3.1.9. Холодильник бытовой по ГОСТ 26678-85.

3 1.10. Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф с частотой вращения не менее 13000 мин$^{-1}$

3 1 11 Аппарат для встряхивания типа “Вортекс”, скорость вращения 250-3 000мин$^{-1}$
3 1 12 Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды по ГОСТ 6709-72.
3 1 13. Микродозаторы с переменным объемом дозирования: 0,5-10,0 мм^3 (шаг – 0,1 мм^3, точность ±2,5% - 10,0%, воспроизводимость 3% - 7%), 0,5-50,0 мм^3 (шаг – 0,5 мм^3, точность ±2,0% - 5,0%, воспроизводимость 2,5% - 5%); 20,0-200,0 мм^3 (шаг – 1,0 мм^3, точность ±1,5% - 2,0%, воспроизводимость 2% - 3%), 100-1000 мм^3 (шаг – 5 мм^3, точность ±1,0% - 1,5%, воспроизводимость 1% - 2%); 2000-10000 мм^3 (шаг – 10мм^3, воспроизводимостьь 1%-2%).
3 1 14 Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 ТУ16-535-84 или других видов

Примечание: Допускается использование другой аппаратуры и инструментов с аналогичными техническими характеристиками, разрешенных для применения в установленном порядке

3.2. Лабораторная посуда и материалы

3.2 1. Бумага фильтровальная лабораторная ГОСТ 12026-76.
3 2 2 Воронки стеклянные ГОСТ 25336-82 Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические, вместимостью 25, 50, 100, 200, 1 000 см^3 ГОСТ 12738-77
3.2.3. Чашки Петри по ГОСТ 25336-82
3 2.4. Цилиндры стеклянные мерные лабораторные, вместимостью 25, 100, 1 000 см^3 ГОСТ 1770-74
3.2 5 Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф, вместимостью 0,2; 0,5; 1,5 см^3
3 2.6. Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объёмом дозирования до 10; 20, 200, 1 000, 10 000 мм^3

3.3 Реактивы и реагенты

3.3.1. Додецилсульфат натрия (SDS).
3.3.2. Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77.
3 3 3 Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), х/ч ТУ 6-09-11-1721-83.
3.3.4 Альбумин бычий сывороточный сухой (БСА) Корпорация “Сигма Алдрич” (Sigma), кат. № В 4287.
3 3 5 Спирт этиловый ректификованный ГОСТ Р 51652-00.
3 3 6 Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72.
3 3 7 Вода деионизованная ОСТ 11 029.003-80
3 3.8 3%-ный раствор пероксида водорода.

Примечание: Допускается использование других реактивов с аналогичными техническими характеристиками, препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9 000 или EN 29 000

3 3.9. Набор реагентов для выявления и идентификации ГМО растительного происхождения на биологическом микрочипе состоит из набора для выделения ДНК, набора для проведения амПЦР и набора для ДНК гибридизации и ферментного анализа Наборы рассчитаны на сто реакций.
3.3.10 Набор реагентов для пробоподговки (бисер-30 г , лизирующий реагент-60 см^3 (2 флакона), сорбент-2 см^3 (2 пробирки), солевой буфер (10-кратный) – 10 см^3, экстракционный раствор – 10 см^3) ТУ 2643-003-71321417-2004. Порядок приготовления рабочего раствора солевого буфера описан в 4 1 Остальные реагенты готовы к использованию
3.3.11. Набор реагентов для амПЦР ТУ 2643-003-71321417-2004 (включает в себя: сухие смеси реагентов (100 пробирок, каждая пробирка содержит Taq ДНК полимеразу,

дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1 ед, 200 мкМ и 2,5 мМ, а также оптимизированную буферную систему для проведения одной стандартной ПЦР); растворитель, минеральное масло; «+» контроль амплификации – 1 пробирка, 0,5 см^3, праймеры на 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты·

- 35S_п 5' CGG CTA CTC CAA GAA TAT CAA AGA TAC AGT TTC AGA AGA (39 н о),
- 35S_о* 5' CCA TTT TCC TTT TTT ATT GTC CTT TCG ATG AAG TGA CAG A (40 н о),

праймеры на маркерный ген gus из бактерии Escherichia coli:

- gus_ 5' ACC GTA CCT CGC ATT ACC CTT ACG CTG AAG AGA (33 н о),
- gus_о* 5' TGC CCG CTT CGA AAC CAA TGC CTA AAG AGA (30 н о),

праймеры на терминатор nos из агробактерии Agrobacterium tumefaciens:

- nos_п 5' GGA CAA GCC GTT TTA CGT TTG GAA CTG ACA GA (32 н о.),
- nos_о* 5' GCC TGA CGT ATG TGC TTA GCT CAT TAA ACT CCA GA (35 н о),

праймеры на маркерный ген nptII из транспазона Tn5 бактериального происхождения·

- npt_п 5' GTG ACC CAT GGC GAT GCC TGC TTG C (25 н.о),
- npt_о* 5' ACC CAG CCG GCC ACA GTC GAT GAA TCC AGA (30 н о.),

праймеры на промотор ocs из агробактерии Agrobacterium tumefaciens:

- ocs_п 5' AAA AAG TGG CAG AAC CGG TCA AAC CTA AAA GA (32 н о),
- ocs_о* 5' CGT TAT TAG TTC GCC GCT CGG TGT GTC GTA GA (32 н о.).

Праймеры расфасованы в 10 пробирках по 0,5 см^3

Примечание: 35S_п; gus_п; nos_п; nptII_п; ocs_п – обозначают прямые праймеры, 35S_о*; gus_о*; nos_о*; nptII_о*; ocs_о* - обозначают обратные праймеры меченные биотином; н.о. – нуклеотидные остатки

3.3 12. Набор реагентов для ДНК гибридизации и ферментного анализа ТУ 2643-003-71321417-2004: 20xSSC – 50 см^3; диаминобензидин (ДАБ) - 100 таблеток, конъюгат пероксидазы хрена со стрептавидином – 0,1 см^3 с концентрацией 1 мг/ см^3, 1 пробирка

Примечание: Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня изготовления Основную часть реагентов, упакованную в картонную коробку, хранят в сухом тёмном месте при температуре от +2°С до +8°С. В отдельных пластиковых пакетах при температуре –20°С хранят праймеры, положительный контроль и конъюгат стрептавидин-пероксидазы.

4. Подготовка к анализу. *Приготовление растворов*

4 *1 Приготовление 0,5 М ЭДТА (pH 8,0)*

В мерной колбе на 100 см^3 растворить 18,62 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (молекулярный вес 372,2) в 80 см^3 дистиллированной воды. Раствором 30%-ной гидроокиси довести pH раствора до 8,0 дистиллированной водой – объем раствора до метки, перемешать. Хранить в колбе с притёртой пробкой при комнатной температуре до года.

4.2. *Приготовление 10%-ного раствора SDS*

Растворить 10 г SDS в 90 см^3 дистиллированной воды. Хранить при комнатной температуре не более 1 года

4 3 *Приготовление рабочего раствора Солевого буфера*

Содержимое флакона с 10-кратным Солевым буфером (10 см^3) (из набора реагентов) перенести из флакона в цилиндр, довести бидистиллированной водой до отметки 100 см^3 и 96%-ным этиловым спиртом до отметки 300 см^3 и перемешать. Рабочий раствор солевого буфера следует хранить в герметично закрытой посуде при температуре 4^{0}С

5. Отбор и подготовка проб пищевых продуктов для анализа

Отбор проб проводят по государственным стандартам, устанавливающим порядок отбора проб для однородных групп пищевой продукции: ГОСТ 5904-82, 9163-90, 12292-00,10852-86,12430-66, 13979-86, 26313-84, 22617.0-77, 27668-88, 26312-84, 9792-73,7631-85, 12036-85, 51447-99, 135869 3-86, 13440-89, 17109-88, 19341-73, 26809-86, 27668-88, 27853-88, 28741-90, 29142-91, 13634-90, 15877-70, 17110-71, 17109-88, ГОСТ Р 50436-92, 50437-92, 51926-02, ГОСТ Р ИСО 2170-97.

6. Проведение анализа. Выделение ДНК

6.1. В одноразовые центрифужные пробирки типа eppendorf на 1,5 $см^3$ внести 300 мг бисера и 70-80 мг анализируемого материала. Добавить 0,5 мл 5 мМ Na_2-соль ЭДТА и термостатировать при 65°С в течение 30-60 мин. Время инкубации составляет 30 минут для процессированных продуктов (мука, чипсы, детское питание и др) и до 60 мин для зерна. Через каждые 10-15 минут гомогенизировать пробу срезанным наконечником (для каждой пробы использовать индивидуальный наконечник).

6.2 К содержимому пробирки добавить 400 $мм^3$ Лизирующего реагента из набора реагентов и перемешать на вортексе до максимально однородного состояния. Пробу термостатировать при 65°С 60-120 мин.

6.3. После термостатирования пробу, при необходимости, ещё раз гомогенизировать, добавить 500 $мм^3$ бидистиллированной воды и перемешать на вортексе.

6 4 Центрифугировать пробу 1 мин при 5000 g (12 000 об/мин). Прозрачный супернатант перенести в чистую пробирку

6.5 Добавить 20 $мм^3$ сорбента из набора реагентов (перед использованием сорбент следует интенсивно встряхнуть на вортексе) Пробирку поместить на ротатор и перемешивать на вортексе 10 минут (10-20 об/мин).

6.6. Центрифугировать пробу 10 секунд при 5 000 g

6.7. Осторожно, не задевая осадка, удалить супернатант К осадку добавить 200 $мм^3$ Лизирующего реагента из набора реагентов и перемешать на вортексе до однородного состояния Центрифугировать пробу 10 секунд при 5000 g.

6 8. Удалить супернатант. К осадку добавить 1 $см^3$ рабочего раствора солевого буфера из набора реагентов, перемешать содержимое пробирки переворачиванием 5-10 раз Центрифугировать пробу 10 секунд при 5 000g.

6.9. Удалить супернатант, не задевая осадка.

6.10 К осадку добавить 1 $см^3$ рабочего раствора солевого буфера, перемешать на вортексе, центрифугировать пробу 10 секунд при 5 000 g и осторожно удалить супернатант.

6.11. Повторить предыдущий пункт ещё раз.

6 12 Подсушить осадок при 65°С в течение 4-5 минут.

6 13 К осадку добавить 50 $мм^3$ экстракционного раствора из набора реагентов. Отбор раствора из исходного флакона проводить при постоянном помешивании, не допуская выпадения в осадок гранул ионообменной смолы.

6.14. Суспендировать содержимое пробирки на вортексе 5-10 секунд до гомогенного состояния, затем термостатировать 10 минут при 65°С

6 15 Ещё раз суспендировать пробу на вортексе, центрифугировать 1 мин при 5000g

6.16 Супернатант, содержащий очищенную ДНК, перенести в чистую пробирку и хранить при –20°С до проведения ПЦР анализа. При отборе раствора ДНК необходимо избегать захвата осадка, содержащего сорбент.

Примечание: Кроме описанного выше сорбционного метода выделения ДНК, возможно использование метода выделения, с помощью СТАВ (гексадецилтриметиламмониум

бромид), описанного в методических указаниях по определению генетичсски модифицированных источников в продуктах питания растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции (МУК 4.2 1902-04 «Определение генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции»)

7 Амплификация

7 1 Перед проведением реакции вынуть из холодильника необходимое количество микропробирок с сухими реагентами из набора реагентов. Промаркировать соответствующим образом. «-» контроль», «исследуемые пробы», «+» контроль».

7.2. Добавить во все пробирки по 5 мм^3 праймеров.

7.3. Добавить во все пробирки по 10 мм^3 растворителя.

7.4. В пробирку, которая служит отрицательным контролем, добавить 5 мм^3 бидистиллированной воды. В опытные пробирки добавить по 5 мм^3 исследуемой ДНК В пробирку с положительным контролем добавить 5 мм^3 раствора контрольной ДНК.

7.5. Добавить во все пробирки по 20 мм^3 минерального масла (масло не используется в случае, если амплификатор имеет термостатируемую крышку).

7.6. Подготовленные для проведения реакции пробирки перенести в термоблок программируемого термостата и запустить программу амплификации в соответствии с режимами, приведенными в таблице 1

Таблица 1.
Программа проведения амПЦР

Шаг программы	Температура ^{o} С	Время инкубации,сек	Количество циклов
1	94	180	1
2.	94	30	42
3	62,5	30	
4	72	180	1

Примечание: Для пипетирования жидкостей без примесей рекомбинантной ДНК (праймеры, растворитель, вода), необходимо иметь отдельный комплект микродозаторов, не используемых при пробоподготовке или работах с ДНК- содержащими препаратами При подготовке смесей для проведения амПЦР каждую пробирку открывают только перед отбором или внесением проб, а по окончании манипуляции сразу же закрывают Запрещается открывать одновременно несколько микропробирок с пробами и оставлять их открытыми на длительное время.

7 7 После завершения реакции микропробирки необходимо передать в помещение, в котором будет проводиться гибридизация Отбор пробы для гибридизации проводится из-под слоя минерального масла, в случае его использования.

7.8. Подготовка проб для амПЦР и их гибридизации с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе в одном помещении **не допускается**. Реакционные смеси после амплификации содержат в высоких концентрациях фрагменты ДНК, контаминация которыми помещений, оборудования и реактивов может привести к получению ложноположительных результатов

8. Проведение ДНК гибридизации

8.1. Приготовить рабочие разведения раствора 20xSSC (3M NaCl, 0,3 M цитрат натрия, pH 7,4): 2xSSC, 0,1%SDS; 0,1xSSC; 0,1xSSC, 0,1% SDS; 0,01x SSC Для приготовления 100 $см^3$ раствора можно воспользоваться таблицей 2:

Таблица 2.
Приготовление рабочих растворов SSC

Раствор:	20 x SSC	10%-ный SDS	H_2O дист.
2xSSC, 0,1% SDS	10 $см^3$	1 $см^3$	89 $см^3$
0,1 x SSC	0,5 $см^3$	-	99,5 $см^3$
0,1xSSC, 0,1% SDS	0,5 $см^3$	1 $см^3$	98,5 $см^3$
0,01 x SSC	0,05 $см^3$	-	99,95 $см^3$

8.2 Микропробирки с продуктами амплификации ДНК центрифугировать 1-2 секунды для сбора пробы на дне пробирки и держать далее только в вертикальном положении Добавить в каждую микропробирку 5 $мм^3$ 20 x SSC и 0,2 $мм^3$ 10% SDS, перемешать и центрифугировать 1-2 секунды Распределить полученную смесь по поверхности микрочипа, содержащей зоны иммобилизованных олигонуклеотидов

8.3. Поместить микрочип во влажную камеру (например, в чашку Петри со смоченным дистиллированной водой бумажным фильтром) и поставить на 1 час в воздушный термостат с температурой 42°C

8.4. По окончании реакции капли смыть буфером 2 x SSC, 0,1% SDS и затем тщательно промыть чип следующими растворами.

- 2 x SSC, 0,1% SDS – 1 раз 5 минут;
- 0,1 x SSC, 0,1% SDS – 2 раза по 5 минут;
- 0,1 x SSC – 5 раз по 1 минуте;
- 0,01 x SSC в течение 10 секунд

9. Проведение ферментного анализа

9 1 Исходный стрептавидин-пероксидазный конъюгат разбавить в 200 раз буфером 1 x SSC, содержащим 1% BSA (бычий сывороточный альбумин), из расчёта 25 $мм^3$ на микрочип. Например, необходимо проанализировать 5 микрочипов Для этого потребуется 25 x 5 = 125 $мм^3$ раствора конъюгата. Готовят с небольшим избытком, 150 $мм^3$ раствора Для этого 1,5 мг BSA растворяют в 150 $мм^3$ 1 x SSC, а затем добавляют 0,75 $мм^3$ исходного конъюгата.

9.2. Нанести 25-30 $мм^3$ разведённого конъюгата на рабочую зону микрочипа и поместить его на 30 минут во влажную камеру при комнатной температуре.

9.3. Смыть конъюгат раствором 1 x SSC.

9.4. Залить микрочип раствором 2 x SSC и промыть 5 минут

9.5 Промыть микрочип раствором 1 x SSC.

9.6 Непосредственно перед применением приготовить раствор субстрата – диаминобензидина (ДАБ). Для этого растворить таблетку ДАБ в 1 $см^3$ буфера 0,1 x SSC, добавить 30 $мм^3$ 3%-ного раствора пероксида водорода и перемешать. Раствор использовать немедленно.

9.7. Залить рабочую зону микрочипа раствором субстрата и выдержать от 2 до 10 минут при комнатной температуре. В случае положительной реакции появляются коричневые пятна окисленного субстрата.

9 8. Промыть микрочип дистиллированной водой, встряхнуть капли воды и поместить в термостат 42°С на 5-10 минут. После сушки микрочип с окрашенными зонами необходимо хранить в темном месте

10. Сканирование биологических микрочипов

10 1 В соответствии с руководством по эксплуатации, поставляемым в комплекте с аппаратно-программным комплексом «ДЕГМИГЕН-001», подготовить сканер микрочипов к работе.
10.2. Поместить микрочип в рамку для сканирования, зафиксировать его и закрыть рамку
10 3. Запустить программу сканирования, функционирующую в диалоговом режиме, дождаться появления на мониторе приглашения к сканированию и только после этого вставить рамку с микрочипом в приёмное окно детектора
10 4 После завершения сканирования микрочипа необходимо сохранить изображение (Приложение 1Б), присвоив файлу соответствующее имя.
10 5 Для завершения работы с программой сканирования следует нажать в диалоговом окне клавишу «ВЫХОД»

11. Анализ изображений биочипов

11.1. Запустить программу обработки изображения микрочипа "Arra"
11 2 Ввести оцифрованное изображение в программу, для этого нужно выбрать опцию меню «Файл», и затем открыть изображение В появившемся диалоговом окне выбрать формат, в котором представлены изображения, и выбрать в списке нужный файл, после чего изображение появится в основном окне программы.
11.3. Провести операцию разметки матрицы, чтобы совместить центры измерительных зондов с центрами пятен решетки в изображении, для этого выбрать опцию меню «Анализ» и затем «Разметка матрицы». Разметка начинается с рисования прямоугольника, боковые стороны которого проходят через центры узлов крайних столбцов. Для этого нужно щелкнуть левой кнопкой мыши в центре левого верхнего пятна/ячейки Затем, держа кнопку нажатой, переместить правую нижнюю вершину появившегося прямоугольника в центр нижнего правого узла
11.4. В результате предварительной разметки на экране появится четырехугольник, с внутренними линиями, расположенными равномерно, в соответствии с заданным числом столбцов матрицы
11 5 Чтобы завершить разметку и закрыть диалоговое окно, нужно нажать клавишу «Принять»
11.6 После завершения базовой разметки проводят автоматическую коррекцию положения зондов. Для этого в меню выбирается опция «Настройки / Автоматическая подстройка».
11.7 Для анализа результатов нужно выбрать опцию меню «Анализ» - «Показать результаты».
11.8. По окончании измерений программа предоставляет возможность подготовки и распечатки протокола испытаний (Приложение 2) Для этого нужно выбрать опцию меню «Файл», и затем «Заполнить протокол». После этого появится окно с формой для заполнения. После того как она будет заполнена, нажать кнопку «Выход»

12. Интерпретация результатов

12.1. Появление регистрируемого компьютерной программой Arra оптического сигнала в одной, нескольких или во всех пяти зонах гибридизации, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, указывает на присутствие рекомбинантной ДНК,

свидетельствующей о наличии ГМО растительного происхождения в анализируемом образце (пробе).

12.2. Отсутствие регистрируемого оптического сигнала во всех пяти гибридизационных зонах, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, указывает на не содержание рекомбинантной ДНК, что свидетельствует о том, что анализируемый образец (проба) не имеет ГМО растительного происхождения.

12.3 Появление оптического сигнала в зоне гибридизации при использовании отрицательного контроля амплификации, свидетельствует о получении ложноположительного результата. Причиной может быть загрязнение реактивов и/или оборудования В этом случае необходимо обработать поверхности лабораторных столов и оборудования раствором 1Н соляной кислоты, заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ

12.4. Отсутствие оптического сигнала при использовании положительного контроля амплификации, свидетельствует о получении ложноотрицательного результата. Причиной могут быть потеря активности одного из компонентов реакционной смеси для амПЦР и/или гибридизации с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе. В этом случае необходимо заменить реактивы на свежеприготовленные и повторить анализ

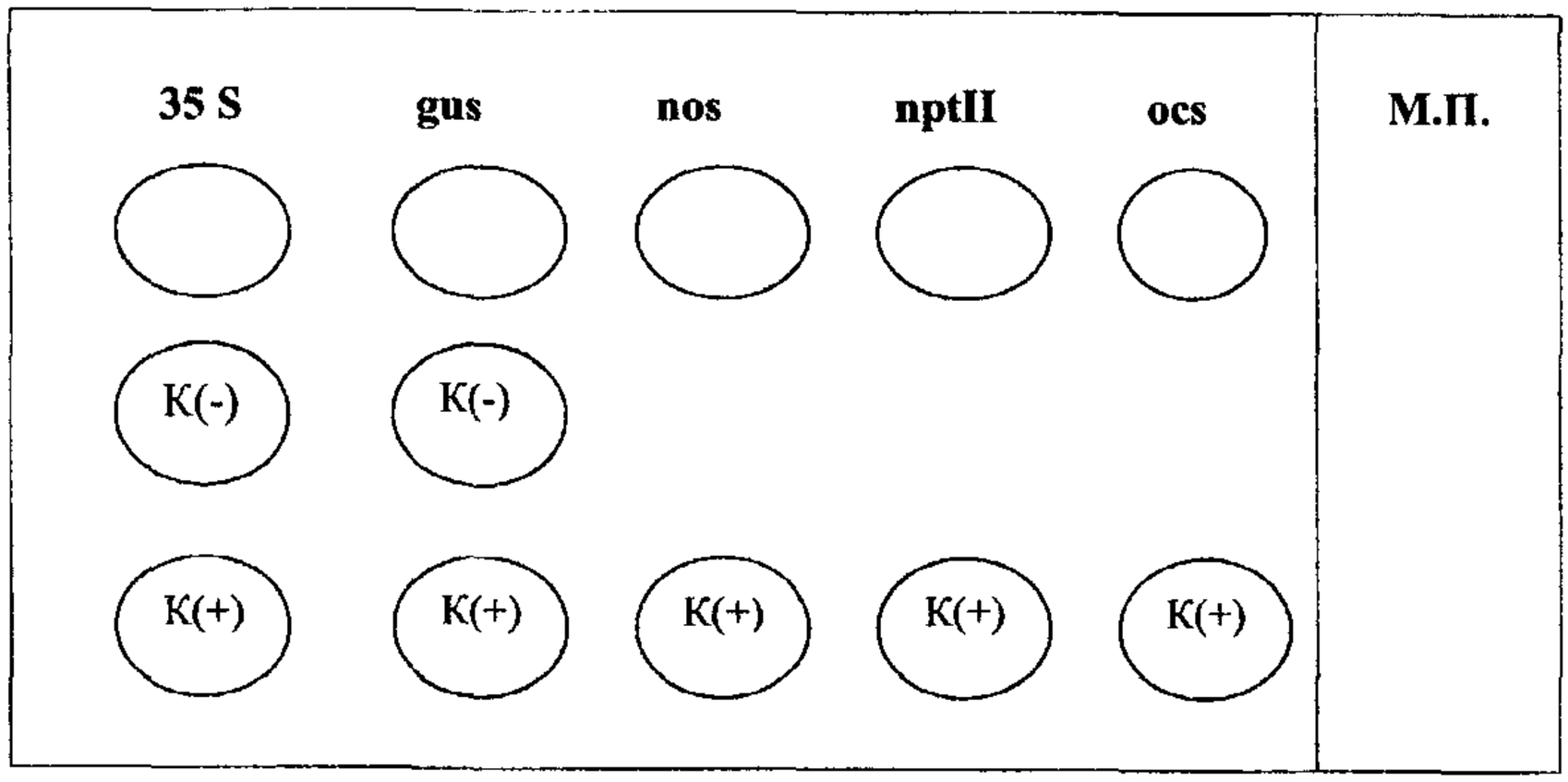
13. Организация рабочих мест

Организация рабочих мест для проведения исследований, описанных в настоящих методических указаниях, проводится в соответствии с МУК 4.2.1902-04 «Определение генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения методом полимеразной цепной реакции»

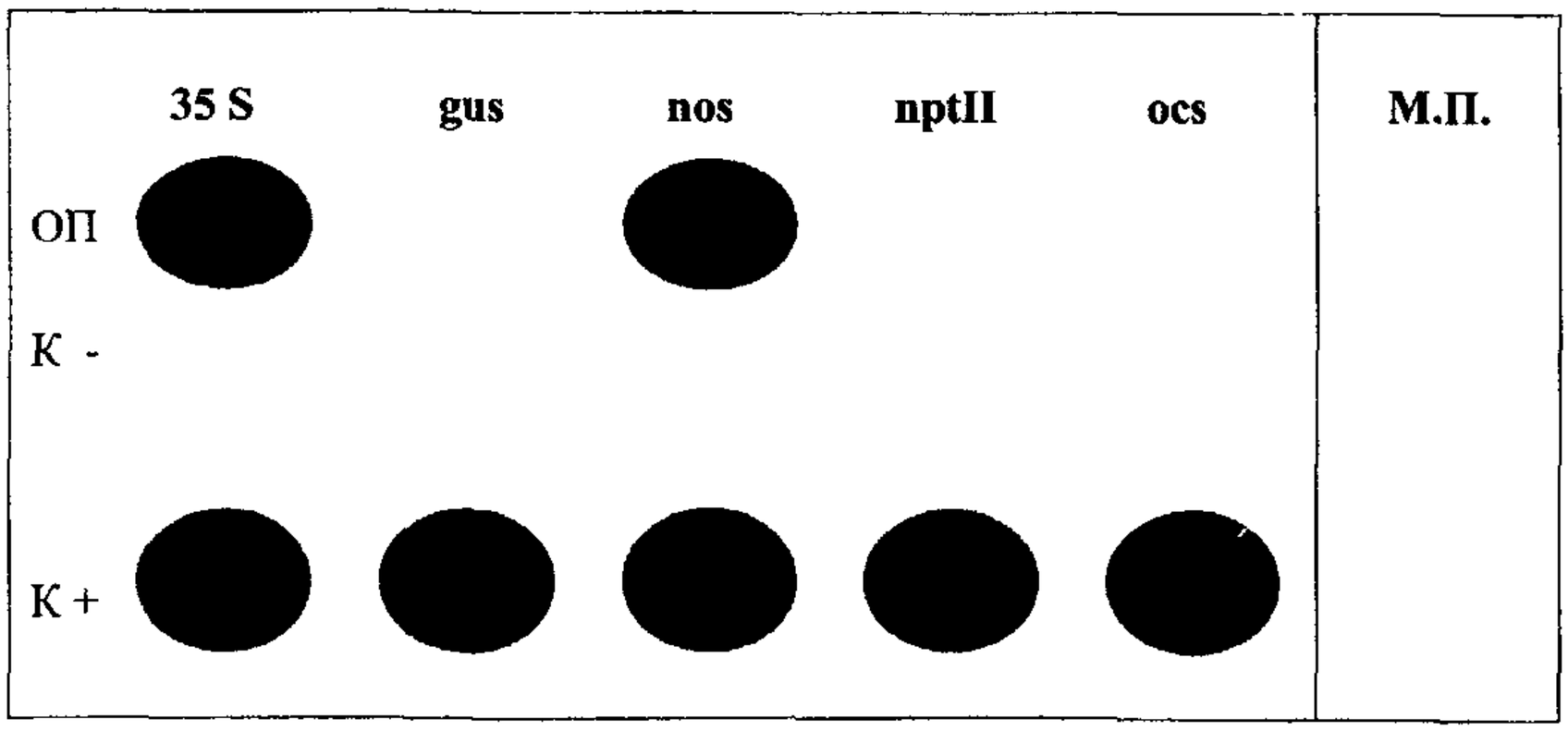
Приложение 1

Пример гибридизационной картины продуктов амПЦР на биологическом микрочипе

А



Б



А – схема негелевого биологического микрочипа для идентификации ГМИ растительного происхождения;
Б – гибридизационная картина на экране компьютера, полученная в результате анализа генетически модифицированной сои, содержащей промотор 35S и терминатор nos

Приложение 2

Форма протокола испытаний по идентификации генно-инженерно-модифицированных организмов (ГМО) растительного происхождения с применением ферментного анализа на биологическом микрочипе

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

Серия АБ № 0000000

№ _____ от « » _____ 200 г.

Продукция_____

Производитель сырья или продукции_____

Предъявитель сырья или продукции_____

Отбор проб произведён в соответствии с нормативным документом на соответствующую группу сырья или продукции_____

Акт отбора проб и техническое задание на испытания №____от_____

Испытания проведены на основании требований

Номер образца_____

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

в образцах № _____ отсутствует, а в образце № ____ присутствует

Маркировка:_____

Годен до_____Штриховой код_____

Результаты испытаний

Номер образца	Трансгенные последовательности				
	35S	gus	nos	npt II	ocs

Результаты анализа _____

_____

_____

_____

Исполнители:

_____ подпись _____ подпись

_____ подпись _____ подпись

Руководитель испытательной лаборатории _____ подпись

МП _____ Фамилия, инициалы

Заключение распространяется на образец, представленный на испытания

Нормативные ссылки

1. Федеральный закон от 30 03 1999 № 52-ФЗ (в редакции от 09 05.2005 № 45-ФЗ) «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Закон Российской Федерации от 07.02.1992 № 2300-I. (в редакции от 21.12.2004 № 171) «О защите прав потребителей»
3. Постановления Правительства Российской Федерации от 24.07.2000 № 554 (в редакции от 15.09.2005 № 569) «Об утверждении Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании».
4. Постановления Правительства Российской Федерации от 15.09.2005 № 569 «О Положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации»
5. Постановления Правительства Российской Федерации от 30.06 2004 № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».
6. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 08 11.2000 № 14 «О порядке проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников».
7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31.12 2004 № 13 «Об усилении надзора за пищевыми продуктами, полученными из ГМИ».
8. СанПиН 2.3.2. 1078-01 «Продовольственное сырьё и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».
9. ГОСТ 5904-82с «Изделия кондитерские Правила приемки, методы отбора и подготовки проб».
10. ГОСТ 9163-90 «Консервы мясные и мясорастительные "Сосиски". Технические условия»
11. ГОСТ 12292-2000 «Консервы рыбные с растительными гарнирами. Технические условия».
12. ГОСТ 10852-86 «Семена масличные Правила приемки и методы отбора проб»
13. ГОСТ 12430-66 «Продукция сельскохозяйственная Методы отбора проб при карантинном досмотре и экспертизе».
14. ГОСТ 26313-84 «Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб»
15. ГОСТ 22617.0-77 «Семена сахарной свеклы. Правила приемки и методы отбора проб».
16. ГОСТ 27668-88 «Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб».
17. ГОСТ 26312 1-84 «Крупа. Правила приемки и методы отбора проб».
18. ГОСТ 9792-73 «Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб».

19 ГОСТ 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний»

20. ГОСТ 12036-85 «Семена сельскохозяйственных культур. Правила приемки и методы отбора проб».

21 ГОСТ Р 51447-99 «Мясо и мясные продукты Методы отбора проб».

22. ГОСТ 17109-88 «Соя Требования при заготовках и поставках»

23. ГОСТ 19341-73 «Консервы рыбные. Печень рыб с растительными добавками. Технические условия».

24 ГОСТ 26809-86 «Молоко и молочные продукты. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу»

25. ГОСТ 27668-88 «Мука и отруби Приемка и методы отбора проб».

26 ГОСТ 27853-88 «Овощи соленые и квашеные, плоды и ягоды моченые. Приемка, отбор проб»

27. ГОСТ 28741-90 «Продукты питания из картофеля. Приемка, подготовка проб и методы испытаний»

28. ГОСТ 29142-91 «Семена масличных культур. Отбор проб».

29. ГОСТ 13634-90 « Кукуруза. Требования при заготовках и поставках».

30. ГОСТ 15877-70 «Кукуруза сахарная консервированная Технические условия».

31. ГОСТ 17110-71 « Соя (промышленное сырье) Требования при поставках. Технические условия».

32 ГОСТ 17109-88 «Соя. Требования при заготовках и поставках».

33. ГОСТ Р 50436-92 «Зерновые. Отбор проб зерна».

34. ГОСТ Р 50437-92 «Бобовые культуры в мешках Отбор проб»

35. ГОСТ Р 51926-2002 «Консервы. Икра овощная Технические условия»

36. ГОСТ ИСО 2170-97 «Зерновые и бобовые Отбор проб молотых продуктов»