

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение генетически модифицированных
микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих
генетически модифицированные аналоги,
в пищевых продуктах методами полимеразной
цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и
ПЦР с электрофоретической детекцией**

Методические указания
МУК 4.2.2305—07

1. Разработаны: ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, Ю. В. Ананьина, Н. А. Зигангирова, В. Г. Лунин, Б. С. Народицкий, Л. Н. Нестеренко, В. П. Попадьин, А. А. Ховаев); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, Л. П. Гульченко, Г. Е. Иванов); ГУ НИИ питания РАМН (В. А. Тутельян, С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина); ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН (В. В. Зверев, Б. Ф. Семенов).

2. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко 30.11.2008 № 80.

3. Введены в действие с 30.11.2007.

4. Зарегистрированы в Министерстве юстиции Российской Федерации 06 февраля 2008 г., регистрационный номер 11117.

5. Введены впервые

УТВЕРЖДЕНО
Постановлением Главного
государственного санитарного врача
Российской Федерации
от 30 ноября 2007 г. № 80

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Определение генетически модифицированных
микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих
генетически модифицированные аналоги,
в пищевых продуктах методами полимеразной
цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и ПЦР
с электрофоретической детекцией**

**Методические указания
МУК 4.2.2305—07**

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают методы определения генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (ГММ) в пищевой продукции, полученной из/или с использованием генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги (МГМА), посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или ПЦР с детекцией результатов методом электрофореза.

1.2. Методические указания предназначены для применения в лабораториях учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также в других испытательных лабораториях, аккредитованных в установленном порядке на право проведения исследований пищевых продуктов и продовольственного сырья.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единого методического подхода для определения ГММ в пищевых продуктах, продовольственном сырье, пищевых и биологически активных добавках к пище.

2. Общие положения

2.1. Методические указания содержат описание молекулярно-генетических методов идентификации ДНК (дезоксирибонуклеиновых кислот) генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов в пищевых продуктах, полученных из/или с использованием генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги. Методы являются скрининговыми и обеспечивают выявление наиболее типичных маркерных и селективных генов, используемых в генетических конструкциях по технологии рекомбинантных ДНК в различных группах микроорганизмов (бактерии, дрожжи, плесневые грибы), используемых в пищевой промышленности. Идентификация этих генов методом ПЦР позволяет проводить качественный анализ пищевой продукции на наличие ГММ.

2.2. Методические указания предусматривают также количественный анализ содержания ДНК ГММ посредством использования специальных стандартов ДНК с известной концентрацией в формате ПЦР в реальном времени.

2.3. При обнаружении генетических модификаций методом ПЦР проводят дополнительные исследования с целью идентификации разрешенных (в том числе путем подтверждения их принадлежности к конкретной генетической конструкции) или для выявления не разрешенных для реализации населению и использованию в пищевой промышленности в Российской Федерации ГММ и пищевых продуктов на основе ГММ. Исследования проводят в соответствии с методическими указаниями, официально утвержденными в установленном порядке.

2.4. Идентификация ГММ, разрешенных для реализации населению и использования в пищевой промышленности в Российской Федерации, в образцах продукции и/или используемых культурах штаммов ГММ, проводится на основании сведений, представляемых изготовителем (разработчиком) в Роспотребнадзор, с полной информацией:

- о генной вставке (описание источника и нуклеотидной последовательности целевого гена и его регуляторных элементов; описание средств доставки целевого гена в клетки реципиента – физическая карта вектора, наличие полилинкеров и селективных маркеров);

- о методах идентификации и количественного определения ДНК ГММ.

2.5. Представленные в методических указаниях методы выделения ДНК из образцов пищевой продукции, проведения амплификации с детекцией продуктов ПЦР путем электрофореза или в режиме реального

времени с использованием специального оборудования, документирования и анализа получаемых результатов являются обязательными при проведении как качественных, так и количественных исследований ГММ и МГМА.

3. Молекулярно-генетический анализ пищевой продукции, полученной с использованием генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги, методом ПЦР с детекцией результатов методом электрофореза

3.1. Необходимость проведения лабораторных исследований для конкретных видов пищевой продукции, полученной с использованием ГММ и МГМА, определяется экспертом с учетом анализа представленной заявителем документации, перечня микроорганизмов, используемых в пищевой промышленности и имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги. Экспертные исследования включают подтверждение данных, предоставленных заявителем, а при необходимости – проверку на наличие возможных недеklarированных генетических модификаций.

3.2. Для обнаружения ГММ проводят исследования на наличие трансгенов (чужеродных генов), регуляторных или маркерных векторных последовательностей. Наличие таких последовательностей свидетельствует о произведенных генетических модификациях. Обнаружение последовательностей таких генов производят с помощью специфичного и высокочувствительного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

3.3. Рекомендуемые стратегии международных организаций (ФАО/ВОЗ) для выявления генетических модификаций предусматривают определение наиболее часто употребляемых последовательностей векторов – плазмид, с помощью которых генетическая информация вводится в клетку. В качестве маркеров используют гены, по которым проводят селекцию модифицированных клеток (гены антибиотикорезистентности, бактериоцинов), последовательности регуляторных векторных генов (полилинкеры, промоторы или терминаторы), а также последовательности мигрирующих элементов. Обнаружение таких последовательностей свидетельствует о возможных не документированных генетических модификациях и требует проведения дополнительных исследований штаммов и/или продуктов.

3.4. Проведение дополнительных исследований осуществляют с использованием методов гибридизационного и рестрикционного анали-

за, секвенирования, анализа функционирования целевой вставки (изучение РНК и белка, продуцируемых чужеродной ДНК) в соответствии с официально утвержденными методами анализа.

3.5. Для качественного определения ДНК генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов в пищевых продуктах и биологически активных добавках к пище (БАД) методом ПЦР используют тест-системы, включающие многокомпонентные наборы реагентов и праймеров (искусственно синтезированных олигонуклеотидов, комплементарных соответствующим участкам ДНК-мишени), предназначенные для выявления селективных маркерных генов, наиболее часто употребляемых при конструировании ГММ. Обнаружение маркерных генов у штаммов микроорганизмов, используемых при производстве пищевых продуктов, свидетельствует о произведенных генетических модификациях.

В тест-системы входят праймеры, фланкирующие следующие последовательности:

1) гена *ermC*, кодирующего устойчивость к эритромицину, плазмиды pE194 *Staphylococcus aureus* (размер фрагмента 349 п.н.);

2) гена *tetO*, кодирующего устойчивость к тетрациклину хромосомы *Streptococcus pneumoniae* (размер фрагмента 242 п.н.);

3) гена *amp*, кодирующего устойчивость к ампициллину, плазмиды pBR322 *Escherichia coli* (размер фрагмента 321 п.н.);

4) гена *lacZ*, кодирующего фермент β-галактозидазу, хромосомы *Escherichia coli* (размер фрагмента 158 п.н.);

5) гена *ori*, кодирующего ориджин репликации, плазмиды p15A *Escherichia coli* (размер фрагмента 382 п.н.);

6) гена *hph*, кодирующего устойчивость к гигромицину, хромосомы *Streptomyces hygroscopicus* (размер фрагмента 288 п.н.);

7) гена *Sh ble*, кодирующего устойчивость к блеомицину, хромосомы *Streptomyces verticillus* (размер фрагмента 301 п.н.).

3.6. Выбранный в соответствии с правилами молекулярного дизайна и международных баз данных (с применением программ «Oligo 4.0», «Blast» и их аналогов) набор праймеров обеспечивает проведение многофакторного анализа выбранных последовательностей.

3.7. Для каждой конкретной пары праймеров ПЦР проводят с использованием оптимального соотношения компонентов реакционной смеси, структуры программы амплификации (временных и температурных характеристик каждого этапа амплификации) и адекватного метода детекции результатов, для исключения перекрестных реакций с неспецифическими ДНК и обеспечения необходимого уровня чувствительности и специфичности реакции.

3.8. Специфичность и чувствительность наборов праймеров и реагентов (положительные результаты ПЦР в пробах с контролями ДНК селективных маркеров при концентрации не менее 5×10^4 ГЭ/мл, отсутствие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК при концентрации не менее 1×10^3 ГЭ/мл) подтверждают на препаратах ДНК, выделенных из штаммов микроорганизмов, указанных в табл. 1.

Таблица 1

№	Микроорганизм	Номер штамма
1	<i>Escherichia coli</i>	М-17
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Шт. Биобактон
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Шт. 1К В-2991
4	<i>Bifidobacterium animalis (lactis)</i>	Вb-12
5	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Шт. №1
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Е.Р.317/402
7	<i>Lactobacillus casei</i>	Шт. 163
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	К/А ^Р - 08
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Шт. АлкоИст
10	Композиция бифидобактерий <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. bifidum</i> , № ВКПМ Ас 1248(8-3); <i>B. longum</i> , № Ас 1531 (ДВА -13), <i>B. bifidum</i> 791 БАГ
11	<i>Lactobacillus paracasei, subsp. paracasei</i>	Шт. Dalton
12	Композиция <i>Lactobacillus plantarum</i> + <i>Lactobacillus fermentum</i>	Шт. 8Р-А3 La + шт. 90ТС-4
13	<i>Lactobacillus casei</i>	Шт.-01
14	<i>Lactococcus cremoris</i>	Шт. 322
15	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Шт. КТс 3 Е.А.

3.9. Для выявления ДНК генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов в пробах с различными уровнями содержания микробной ДНК и ДНК пищевого субстрата используют два вида тест-систем:

- комплект № 1А для выделения ДНК из ферментных препаратов, стартерных и заквасочных культур, БАД;

- комплект № 1Б для выделения ДНК из пищевых продуктов.

3.10. Выделение ДНК из бактериальных культур с помощью Комплекта № 1А включает лизис бактериальных клеток с последующим осаждением ДНК на двуокиси кремния. Выделение ДНК из образцов пищевых продуктов с помощью Комплекта № 1Б включает предвари-

тельную обработку пробы гомогенизированных образцов протеиназой К, лизис, дополнительную обработку депротеинизирующим раствором и осаждение ДНК на двуокиси кремния.

3.11. Для выявления ГММ и МГМА в пищевых продуктах используют следующие материалы, оборудование, реактивы:

1) программируемый термостат (ДНК-амплификатор) типа «Терцик МС2» или иные типы амплификаторов, зарегистрированные в Российской Федерации в установленном порядке;

2) термостат, поддерживающий температуру 45 °С, для пробирок объемом 1,5 мл;

3) центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин для пробирок вместимостью 1,5 и 0,5 мл типа «эппендорф»;

4) встряхиватель вибрационный типа «вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин;

5) прибор для горизонтального электрофореза;

6) источник постоянного тока;

7) водяная баня с подогревом до 95 °С или СВЧ-печь;

8) ультрафиолетовый трансиллюминатор;

9) очки/маска защитные;

10) холодильник бытовой электрический;

11) морозильная камера, обеспечивающая температуру –20 °С или ниже;

12) гомогенизатор типа «SilentCrusher» или других моделей;

13) ступка фарфоровая с пестиком;

14) пинцет медицинский;

15) ножницы медицинские;

16) скальпель медицинский;

17) весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности;

18) дистиллятор;

19) анализатор потенциометрический;

20) облучатель бактерицидный настенный;

21) дозаторы с переменным объемом дозирования 0,2—2,0 мм³ с шагом 0,01 мм³, 0,5—10,0 мм³ с шагом 0,01 мм³, 2,0—20,0 мм³ с шагом 0,01 мм³, 20,0—200,0 мм³ с шагом 0,1 мм³, 100,0—1 000,0 мм³ с шагом 1 мм³, 2,0—10,0 см³ с шагом 0,1 см³;

22) пробирки типа «эппендорф» вместимостью 1,5 мл;

23) пробирки типа «эппендорф» для ПЦР вместимостью 0,5 мл;

24) наконечники полимерные объемом 1—200 мкл;

25) наконечники полимерные объемом 200—1 000 мкл;

26) перчатки резиновые;

27) колбы плоскодонные конические разной вместимости;

28) цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1 000 см³;

29) воронки стеклянные;

30) штативы для пробирок объемом 1,5 и 0,5 мл;

31) комплект № 1А для выделения ДНК из ферментных препаратов, стартерных и заквасочных культур, БАД к пище;

32) комплект № 1Б для выделения ДНК из пищевых продуктов;

33) комплект № 2 «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов»;

34) комплект № 3 «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов»;

35) реактивы:

- тритон X-100,
- гуанидина гидрохлорид,
- ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота),
- додецилсульфат натрия,
- суспензия двуокиси кремния,
- фенол водонасыщенный,
- хлороформ водонасыщенный,
- спирт этиловый ректификованный,
- ацетат аммония,
- протеиназа К,
- магния хлорид,
- калия хлорид,
- водный раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов (0,1 М),
- крезоловый красный,
- термостабильная ДНК-полимераза,
- масло вазелиновое,
- трис-ацетат,
- ледяная уксусная кислота,
- агароза для электрофореза,
- бромистый этидий,
- вода деионизированная.

3.12. Допускаются к использованию тест-системы, комплекты (наборы) реагентов и материалы аналогичного назначения других типов, разрешенные к применению в установленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с настоящими методическими указаниями.

3.13. Отобранные согласно установленному порядку и нормам отбора проб (в соответствии с официально утвержденными нормативными

и техническими документами) образцы подготавливают к процедуре выделения ДНК ГММ и МГМА двумя способами, в зависимости от их принадлежности к группам пищевой продукции:

- из ферментных препаратов, заквасочных и стартерных культур, БАД готовят растворы 30 %-й концентрации в стерильной деионизированной воде. Для этого вносят 300 мг (мкл) порошка или суспензии исходного образца в 700 мкл стерильной деионизированной воды и перемешивают на вихревом смесителе в течение 3—5 с. При необходимости образец предварительно измельчают до гомогенного состояния в ступке или с помощью гомогенизатора;

- из других пищевых продуктов готовят растворы 50 %-й концентрации, для чего к 500 мг (мкл) пробы добавляют 500 мкл стерильной деионизированной воды и перемешивают на вихревом смесителе в течение 3—5 с. Твердый образец предварительно измельчают до гомогенного состояния в ступке или с помощью гомогенизатора.

Подготовленные образцы используют для анализа в тот же день. Допускается хранение образцов при температуре минус 20 °С не более 2-х недель.

3.14. Выделение ДНК ГММ и МГМА из образцов исследуемой пищевой продукции проводят с использованием комплектов (наборов) реагентов для выявления селективных маркеров генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов. Допускается применение фенол-хлороформного или другого адекватного метода экстракции ДНК.

3.15. Выделение ДНК из заквасочных и стартерных культур, БАД к пище, ферментных препаратов проводят с использованием Комплекта № 1А «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов».

Комплект № 1А для выделения ДНК включает:

- лизирующий раствор, содержащий гуанидинтиоцианат (раствор 1) – 1 фл. (30 мл);
- раствор для отмывки, содержащий гуанидинтиоцианат (раствор 2) – 1 фл. (15 мл);
- раствор для отмывки (раствор 3) – 2 фл. (по 70 мл);
- суспензию двуокиси кремния – 1 пробирку (0,5 мл).

3.16. Выделение ДНК комплектом № 1А включает следующие этапы:

- исследуемый материал в объёме 700 мкл центрифугируют в течение 10 мин при комнатной температуре (18—25 °С) при 12 000 об./мин.;
- удаляют 600 мкл надосадочной жидкости; оставшийся материал (100—110 мкл) тщательно перемешивают в пробирке на вортексе и до-

бавляют к суспензии 300 мкл раствора 1 и 5 мкл суспензии двуокиси кремния;

- пробы инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе;
- пробы центрифугируют в течение 30 с, при комнатной температуре при 12 000 об./мин, супернатант удаляют;
- к осадку добавляют 150 мкл раствора 2, встряхивают его на вортексе и центрифугируют в течение 30 с при комнатной температуре при 12 000 об./мин, супернатант удаляют;
- к осадку добавляют 700 мкл раствора 3, встряхивают его на вортексе и центрифугируют в течение 30 с при комнатной температуре при 12 000 об./мин, супернатант удаляют; проводят повторную процедуру отмывки;
- дополнительным центрифугированием с последующим удалением супернатанта убирают остатки раствора 3, пробы подсушивают в течение 5 мин при температуре 45 °С, оставляя пробирки открытыми;
- добавляют в каждую пробирку 50 мкл деионизированной воды, перемешивают на вортексе и инкубируют в течение 5 мин при температуре 45 °С;
- пробы центрифугируют при комнатной температуре в течение 30 с при 12 000 об./мин, водную фазу отбирают в другую пробирку и используют в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации либо хранят при температуре –20 °С не более двух недель.

3.17. Выделение ДНК ГММ и МГМА из пищевых продуктов проводят с использованием Комплекта № 1Б «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов». При повышенном содержании жиров проводится дополнительная экстракция суспензией неполярных растворителей с водой для перевода содержащейся в пищевом продукте ДНК в водную фазу, в которой и производится дальнейшая очистка.

Комплект № 1Б для выделения ДНК из пищевых продуктов включает:

- раствор 1 (лизирующий буфер, pH 8,0) – 1 фл. (15 мл);
- раствор 2 (смесь фенола с хлороформом, 1 : 1) – 1 фл. (20 мл);
- раствор 3 (хлороформ) – 1 фл. (20 мл);
- раствор 4 (ацетат аммония 5М) – 1 фл. (5,0 мл);
- раствор 5 (спирт этиловый 96 %) – 4 фл. (по 20 мл);
- раствор 6 (спирт этиловый 75 %) – 1 фл. (12 мл);
- раствор 7 (ТЕ-буфер, pH 8,0) – 1 фл. (6,0 мл);
- протеиназу К – 1 пробирку (3,0 мг).

3.18. Выделение ДНК комплектом № 1Б включает следующие этапы:

- раствор 1 прогревают при температуре 25 °С до полного растворения осадка, непосредственно перед применением к раствору 1 добавляют протеиназу К до концентрации 200 мкг/мл (0,001 г на 5,0 мл);
- в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл вносят 100 мкл гомогенизированного образца, добавляют 100 мкл раствора 1, перемешивают на вихревом смесителе в течение 3—5 с;
- пробирки инкубируют при температуре 55 °С в течение 40 мин;
- добавляют 200 мкл (равный объем) раствора 2, перемешивают на вихревом смесителе в течение 10 с и центрифугируют при комнатной температуре (18—25 °С) в течение 5 мин при 10 000—12 000 об./мин (10 000—13 000 g);
- отбирают верхнюю (водную) фазу и вносят ее в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, в эту пробирку добавляют 200 мкл (равный объем) раствора 3;
- перемешивают на вихревом смесителе в течение 3—5 с и центрифугируют при комнатной температуре 2 мин при 10 000—12 000 об./мин (10 000—13 000 g);
- отбирают водную фазу (200 мкл) и вносят ее в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, в эту пробирку добавляют 40 мкл раствора 4 и 720 мкл (3 объема) раствора 5; перемешивают на вихревом смесителе в течение 3—5 с;
- инкубируют при комнатной температуре в течение 40 мин;
- центрифугируют при комнатной температуре (18—25 °С) в течение 15 мин при 12 000 об./мин (13 000 g); супернатант удаляют;
- в пробирку вносят 100 мкл раствора 6;
- центрифугируют в течение 1 мин при комнатной температуре при 12 000 об./мин (13 000 g); супернатант удаляют; осадок сушат на воздухе в течение 10 мин;
- растворяют осадок в 50 мкл раствора 7; полученные образцы ДНК используют для дальнейшего анализа.

3.19. Проведение ПЦР осуществляют с использованием Комплекта № 2 реагентов для амплификации ДНК «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов».

Комплект № 2 реагентов для амплификации ДНК включает:

- ПЦР-смесь 1 (реакционный буфер, смесь олигонуклеотидных праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов) – 8 пробирок по 1 300 мкл;
- ПЦР-смесь 2 (термостабильная ДНК-полимераза) – 4 пробирки (200 мкл);
- масло минеральное – 8 пробирок по 1 300 мкл;

- положительные контрольные образцы ДНК (плазмидная ДНК с клонированным специфическим фрагментом соответствующих маркерных генов) – 4 пробирки по 30 мкл;

- отрицательные контрольные образцы (плазмидная ДНК рЕТ-9) – 4 пробирки по 30 мкл.

3.20. Проведение ПЦР с использованием Комплекта № 2 включает следующие этапы:

- перед началом работы вынимают из морозильной камеры комплект реагентов для амплификации (кроме ПЦР-смеси 2), размораживают содержимое пробирок при комнатной температуре, тщательно перемешивают на вихревом смесителе в течение 10 с и помещают все пробирки в холодильник;

- амплификационные пробирки вместимостью 0,2 (или 0,5) мл маркируют в соответствии с маркировкой анализируемых образцов, пробирки для положительного контрольного образца ДНК маркируют как ПК, для отрицательного – ОК;

- рабочий раствор для проведения реакции амплификации готовят в количестве, достаточном для анализа всех проб (при анализе N образцов рабочий раствор готовится в количестве, необходимом для анализа N+1 образцов); для этого в пробирку вместимостью 1,5 мл вносят из расчета на одну пробу по 25 мкл ПЦР-смеси 1 и по 2,0 мкл ПЦР-смеси 2; тщательно перемешивают;

- в каждую пробирку с анализируемыми образцами и в пробирки ПК и ОК вносят по 27 мкл рабочего раствора;

- в каждую пробирку добавляют по 1 капле (или 20 мкл) минерального масла;

- в каждую пробирку с анализируемыми образцами вносят под масло по 3,0 мкл исследуемой ДНК (используют наконечники с аэрозольным барьером) и закрывают их;

- в пробирку, маркированную ОК, вносят под масло 3,0 мкл отрицательного контрольного образца и закрывают ее;

- в пробирку, маркированную ПК, вносят под масло 3,0 мкл положительного контрольного образца ДНК и закрывают ее;

- содержимое пробирок осторожно перемешивают пипетированием и центрифугируют при комнатной температуре в течение 5 с при 10 000 об./мин (11 000 g);

- все пробирки устанавливают в блок амплификатора и проводят амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 30 мкл; программа амплификации представлена в табл. 2.

Таблица 2

№ п/п	Температура	Время	Количество повторов
1	37 °С	10 мин	1 раз
2	95 °С	10 мин	1 раз
3	94 °С 60 °С 72 °С	30 с 30 с 30 с	30 раз
4	72 °С	5 мин	1 раз
5	10 °С	Хранение	

3.21. Результаты ПЦР регистрируют методом электрофореза в 1,2 %-м агарозном геле, приготовленном на 1-кратном трис-ацетатном (ТАЕ) буфере с использованием Комплекта № 3 «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов».

3.22. Детекция результатов ПЦР методом электрофореза включает следующие этапы:

- приготовление ТАЕ буфера: 20 мл 50-кратного концентрированного ТАЕ буфера вносят в мерную колбу вместимостью 1 000 мл, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают;

- приготовление 1,2 %-го агарозного геля: 0,6 г агарозы растворяют в 50 мл 1 × ТАЕ буфера нагреванием в кипящей водяной бане до полного и равномерного растворения, полученный раствор охлаждают до температуры 60 °С, добавляют 6 мкл 1 %-го раствора бромистого этидия и перемешивают (примечание: бромистый этидий является сильным мутагеном, поэтому все манипуляции с ним и с агарозным гелем выполняют в перчатках);

- проведение электрофореза: полученный раствор агарозы заливают в кювету для геля согласно инструкции к прибору для горизонтального электрофореза;

- для создания стартовых лунок в кювету помещают гребенку с зубцами, полимеризация агарозы происходит при температуре ниже 42 °С в течение 10—20 мин;

- после застывания агарозы осторожно вынимают гребенку и переносят гель в камеру для проведения электрофореза, в камеру заливают 1 × ТАЕ буфер так, чтобы толщина слоя жидкости над гелем составляла приблизительно 5 мм;

- вносят в лунки агарозного геля по 12,5 мкл амплифицированных образцов, подключают к камере источник постоянного тока и проводят электрофорез при напряжении 120 В в течение примерно 20 мин, помещая стартовые лунки ближе к катоду;

- вынимают гель из камеры, переносят его на стекло трансиллюминатора, включают трансиллюминатор и просматривают гель с последующей видео- или фотодетекцией результатов. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, прикладывают к протоколу проведения испытаний.

3.23. Интерпретацию результатов ПЦР проводят следующим образом:

- в положительном контрольном образце ДНК должна выявляться полоса красно-оранжевого цвета, соответствующая по размеру специфическим фрагментам селективных маркеров ГММ;
- в отрицательном контрольном образце полоса красно-оранжевого цвета должна отсутствовать;
- наличие в анализируемом материале полосы красно-оранжевого цвета, располагающейся строго на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, свидетельствует о наличии в исследуемом образце соответствующего селективного маркерного гена ГММ. При отсутствии такой полосы результат считают отрицательным;
- наличие полосы красно-оранжевого цвета в отрицательном контрольном образце, располагающейся на уровне полосы положительного контрольного образца ДНК, считают результатом контаминации.

4. Молекулярно-генетический анализ пищевой продукции, полученной с использованием генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов и микроорганизмов, имеющих генно-инженерно-модифицированные аналоги методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени

4.1. Для выявления ГММ и МГМА в пищевых продуктах методом ПЦР в реальном времени используют следующие материалы, оборудование, реактивы:

- 1) амплификатор с оптической приставкой типа Rotor Gene – 3000, ABI Prism 7000, iCycler IQ или отечественные аналоги;
- 2) компьютер, совместимый с программным обеспечением амплификаторов с оптической приставкой;
- 3) оптические 96-луночные планшеты типа MicroAmp;
- 4) оптические крышки типа MicroAmp;
- 5) оптически – прозрачные адгезивные пленки;
- 6) термостат, поддерживающий температуру 45 °С, для пробирок объемом 1,5 мл;
- 7) центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин для пробирок вместимостью 1,5 и 0,5 мл типа «эппендорф»;
- 8) встряхиватель вибрационный типа «вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин;

- 9) очки / маска защитные;
- 10) холодильник бытовой электрический;
- 11) морозильная камера, обеспечивающая температуру (–20) °С или ниже;
- 12) гомогенизатор типа «SilentCrusher» или других моделей;
- 13) ступка фарфоровая с пестиком;
- 14) пинцет медицинский;
- 15) ножницы медицинские;
- 16) скальпель медицинский;
- 17) весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности;
- 18) дистиллятор;
- 19) анализатор потенциометрический;
- 20) облучатель бактерицидный настенный;
- 21) дозаторы с переменным объемом дозирования: 0,2—2,0 мм³ с шагом 0,01 мм³, 0,5—10,0 мм³ с шагом 0,01 мм³, 2,0—20,0 мм³ с шагом 0,01 мм³, 20,0—200,0 мм³ с шагом 0,1 мм³, 100,0—1 000 мм³ с шагом 1 мм³, 2,0—10,0 см³ с шагом 0,1 см³;
- 22) пробирки типа «эппендорф» вместимостью 1,5 мл;
- 23) пробирки типа «эппендорф» для ПЦР вместимостью 0,5 мл;
- 24) наконечники полимерные объемом 1—200 мкл;
- 25) наконечники полимерные объемом 200—1 000 мкл;
- 26) перчатки резиновые;
- 27) колбы плоскодонные конические разной вместимости;
- 28) цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1 000 см³;
- 29) воронки стеклянные;
- 30) штативы для пробирок объемом 1,5 и 0,5 мл;
- 31) комплект № 2 (модифицированный) реагентов для амплификации ДНК «Набора для выделения ДНК из ферментных препаратов, стартерных и заквасочных культур, БАД к пище» ;
- 32) реактивы:
 - тритон X-100,
 - гуанидина гидрохлорид,
 - ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота),
 - додецилсульфат натрия,
 - суспензия двуокси кремния,
 - фенол водонасыщенный,
 - хлороформ водонасыщенный,
 - спирт этиловый ректификованный,
 - ацетат аммония,
 - протеиназа К,
 - магния хлорид,
 - калия хлорид,

- водный раствор дезоксинуклетидтрифосфатов (0,1 М),
- крезоловый красный,
- термостабильная ДНК-полимераза,
- масло вазелиновое,
- трис-ацетат,
- ледяная уксусная кислота,
- агароза для электрофореза,
- бромистый этидий,
- вода деионизованная.

4.2. Допускаются к использованию оборудование, инструменты и материалы аналогичного назначения других типов, разрешенные к применению в установленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с данным документом.

4.3. Выделение ДНК ГММ и МГМА из заквасочных и стартерных культур, БАД, ферментных препаратов и пищевых продуктов осуществляют в соответствии с п.п. 3.13—3.18 настоящих методических указаний.

4.4. ПЦР в реальном времени осуществляют с использованием модифицированного Комплекта №2 реагентов для амплификации ДНК «Набора реагентов для выявления селективных маркеров генетически модифицированных микроорганизмов». Модификация предусматривает использование в реакционной смеси не только праймеров, но и флуоресцентно-меченых зондов, а также использование контрольной ДНК ГММ с известной концентрацией в нескольких десятикратных разведениях.

4.5. Флуоресцентно-меченые зонды представляют собой олигонуклеотиды, комплементарные амплифицируемой последовательности мишени, содержащие на 5'-конце флуорофор – донор флуоресцентного излучения, а на 3'-конце – его акцептор (гаситель).

Нарастание флуоресцентного свечения наблюдают после физического разобщения флуорофора и гасителя; разобщение флуорофора и гасителя происходит при гибридизации с амплифицируемым фрагментом ДНК за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, разрушающей зонд после его гибридизации с амплифицируемой последовательностью. Рост регистрируемого флуоресцентного свечения происходит пропорционально нарастанию числа ампликонов. Это позволяет регистрировать накопление продуктов амплификации в реальном времени, а сравнение кинетики флуоресценции ДНК-стандартов и исследуемого образца – определять относительную концентрацию ДНК в образце.

4.6. Зонды синтезируют на автоматическом олигонуклеотидном синтезаторе типа ASM102U фосфитамидным методом в режиме DMT-on, используя фосфорамидиты и полимерный носитель типа Glen Reseach. Для введения на 3'-конец зонда метки диметиламинофенилазобензойной кислоты (DABCYL) в качестве гасителя флуоресценции используют фазу 3'-Dabcyl CPG (типа Glen Reseach) в стандартном режиме

синтеза. Введение на 5'-конец зонда флуорофора – донора флуоресценции – осуществляют автоматическим синтезом, при использовании 6-карбоксихлоресцеин-амидита (FAM-фосфорамидит). Первичную очистку зондов осуществляют на колонках типа Poly-Rac, с последующей дополнительной очисткой в полиакриламидном геле.

4.7. Для ПЦР в реальном времени используют ферменты Taq-полимеразы ThermoStar или Taq-полимеразы HotRescue, инактивированные антителами, или полимеразы AmpliTaq Gold, обладающие выраженной 5'-экзонуклеазной активностью.

4.8. Для проведения ПЦР в реальном времени используют систему, состоящую из термоциклера (амплификатора) и флуоресцентного детектора продуктов ПЦР в реальном времени.

4.9. Концентрацию ДНК ГММ в образце определяют путем сравнения кинетики флуоресценции ДНК-стандартов в диапазоне разведений контрольных препаратов (10-кратных разведений контрольной ДНК известной концентрации) и исследуемого образца.

4.10. Амплификацию проводят по двухступенчатой программе, объединяющей стадии отжига и элонгации в один этап; конечная концентрация зондов в реакционной смеси – до 200 нМ.

Реакцию проводят в реакционной смеси объемом 50 мкл, включающей в себя: десятикратный реакционный буфер, адаптированный к используемому типу полимеразы; 250 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидтрифосфатов; 300 нМ каждого из праймеров; 200 нМ флуоресцентно-меченого зонда; 5 ед. Taq-полимеразы.

Амплификацию проводят по программе:

- 1) 1 цикл – 10 мин – 95 °С;
- 2) 50 циклов: 20 с – 95 °С, 1 мин – 65 °С.

4.11. Для постановки ПЦР в реальном времени в используемом приборе для амплификации создают специальный протокол в соответствии с инструкциями по пользованию; после завершения создания протокола проверяют наличие в списке режима компенсации базовой линии ПЦР и отмечают используемые флуоресцентные красители. Контрольную ДНК используют в известных разведениях определенной концентрации (стандартах); количество повторов стандартов определяют в соответствии с руководством по эксплуатации прибора.

4.12. Детекцию результатов ПЦР в реальном времени производят автоматически в рамках созданного протокола в графическом и цифровом виде. Автоматический анализ данных происходит следующим образом: последние 95 % данных, собранных на каждом шаге, фильтруются средневзвешенным методом. Для экспериментов по амплификации выбирают циклы базовой линии для каждой кривой (образцы) индивидуально с учетом общего оптимального значения порога. По значениям стандартов вычисляют стандартную кривую, на основе которой определяют концентрации ДНК ГММ в исследуемых пробах.

Нормативные ссылки

1. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 16.09.2003 № 149 «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» (зарегистрировано в Министерстве юстиции Российской Федерации 16.09.2003, № 5075), Российская газета, № 187, 19.09.2003.

2. СанПиН 2.3.2.1078—01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (зарегистрированы Министерством юстиции Российской Федерации 22.03.2002, регистрационный номер 3326).

3. СанПиН 2.3.2.1293—03 «Гигиенические требования по применению пищевых добавок» (зарегистрированы Министерством юстиции Российской Федерации 02.06.2002, регистрационный номер 4613).

4. Приказ от 19.07.2007 № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок» (зарегистрирован в Министерстве юстиции РФ 20.07.2007, регистрационный номер 9866).

5. Regulation (EC) № 1829/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.

6. Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Produced Using Recombinant-DNA Microorganisms. CAC/GL 46-2003.

7. Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use. /European Food Safety Authority, The EFSA Journal, 2006, 374, 1—115.

Библиографические данные

1. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов /Под ред. И.М. Скурихина и В.А. Тутельяна.—М.: «Брандес – Медицина», 1998.
2. Теоретические и клинические аспекты науки о питании /Под ред. М.Н. Волгарева.—Т. 8, 1987. 210 с.
3. Методические указания МУК 2.3.2.1830—04 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов».
4. Стратегии оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью биотехнологии //Материалы объединенного совещания ФАО/ВОЗ по оценке биотехнологических методов производства и переработки пищевых продуктов с точки зрения их безопасности, 1990, Женева, Швейцария.
5. Оценка некоторых пищевых добавок и контаминантов //Тридцать седьмой доклад Объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам, 1991, Женева, Швейцария.
6. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their derived products intended for food and feed use, The EFSA Journal, 2006, 374, 1—115. 58. Inventory of Microorganisms with a documented history of use in food. Bull. IDF, 2003, № 277.
7. Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Produced Using Recombinant-DNA Microorganisms. CAC/GL 46-2003.
8. Regulation (EC) № 1829/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed.
9. Biotechnology and food safety, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1996, UN Food and Agriculture Organization, Rome.
10. Safety assessment of viable genetically modified microorganisms used in food, ILSI Europe Workshop on the Safety Assessment of Viable GMM, Microbial ecology in health and disease, 1999, 11: 198—207.
11. Protein quality evaluation, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Held in Bethesda, Md, USA, 4—8 December, 1989, FAO Rome.
12. Official methods of analysis, AOAC International, 1996. V.2, chapter 33, 45, 48.
13. Kaufman P.B., Wu W., Kim D., Cseke L.J. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine: CRC Press, 1995.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Издательство «Мир», 1984.
15. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот: Наука, 1985.

16. MacCormick C.A., Griffin H.G., Underwood H.M., Gasson M.J. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food // *J Appl Microbiol*, 1998, 84, 969—980.

17. Gasson M. Genetic manipulation of dairy cultures // *Bulletin of the IDF* 1997, 320: 41—44.

18. Koning W.N. et al. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium // *Curr Opin Microbiol.*, 2000, 3(3):276-282.

19. Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J. Foreign gene expression in yeast: a review // *Yeast*, 1992, 8, 423—488.

20. McKay L.L. Update on dairy starter cultures: genetics and biotechnology of dairy streptococci. In: *Proceedings of the ILSI International seminar on biotechnology*, Tokyo, 1988.

21. Pridmore R.D. et al. Genomics, molecular genetics and the food industry // *J. Biotechnol.*, 2000, 78, 3, 251—258.

22. Holst-Jensen A., Sissel B.R., Lovseth A., Berdal K.G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) // *Ann. Bioanal. Chem.*, 2003, 375: 985—993.

23. Lindemann J. Biotechnology in food: a summary of major issues regarding safety assurance // *Regular Toxicology and Pharmacology*, 1990, 12: 96—104.

24. D.A.Jonas, I. Elmadfa, K.-H. Engel, K.J. Heller, G. Kozianowski et al. Safety Considerations of DNA in Food. *Ann Nutr Metab*, 2001; 45: 235—254.

25. J. Lezaun. Creating a New Object of Government: Making Genetically Modified Organisms Traceable *Social Studies of Science*, Aug 2006; 36: 499—531.

26. Z.S. Olempska-Beer, R.I. Merker, M.D. Ditto, and M.J. DiNovi. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regul Toxicol Pharmacol*, July 1, 2006; 45(2): 144—158.

27. N. Hierro, B. Esteve-Zarzoso, Á. González, A. Mas, and J.M. Guillamón. Real-Time Quantitative PCR (QPCR) and Reverse Transcription-QPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. *Appl. Envir. Microbiol.*, Nov 2006; 72: 7148—7155.

28. K. Ben Amor, E.E. Vaughan, and W.M. de Vos. Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *J. Nutr.*, Mar 2007; 137: 741—747.

29. D. Xu and J.-C. Côté. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53:695—704.

30. R.J. Boyle, R.M. Robins-Browne, and M.L.K. Tang. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am. J. Clinical Nutrition*, Jun 2006; 83: 1256—1264.

31. Inventory of GRAS Notices [<http://vm.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>].

Организация рабочих мест

1. Исследования по идентификации ГММ и МГМА 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. При организации исследований по идентификации ГММ необходимо предусмотреть наличие вспомогательных помещений (комнаты ведения учетной документации; раздевалки для сотрудников; комнаты приема пищи; туалета; подсобных помещений), которые могут быть общими с другими подразделениями учреждения.

2. Для сотрудников лаборатории должна быть предусмотрена спец-одежда: медицинский халат, шапочка, перчатки и сменная обувь.

3. Пробирки с продуктами ПЦР и использованные наконечники к микродозаторам подвергаются первичной обработке растворами, вызывающими деградацию ДНК.

4. По окончании работ обрабатывают рабочие поверхности растворами, вызывающими деградацию ДНК (например, 0,2 %-й раствор ДП-2Т или аналогичный ему). Перед началом работы рабочую поверхность столов дополнительно обрабатывают 70 %-м этиловым спиртом. Ежемесячно проводят профилактическую обработку рабочей поверхности столов и штативов 1 N соляной кислотой.

5. Во всех помещениях лаборатории ежедневно должна проводиться влажная уборка. Для каждого этапа проведения исследований должен быть выделен индивидуальный промаркированный набор уборочного инвентаря. Уборочный инвентарь не допускается использовать для уборки других помещений.