

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

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

**Методы идентификации
и количественного определения новых линий
ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах**

**Методические указания
МУК 4.2.3309—15**

Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015.—15 с.

1. Разработаны ФГБНУ «НИИ питания» (В. А. Тутельян, Н. В. Тышко, Э. О. Садыкова, А. К. Голомидова); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. Ю. Попова, И. В. Брагина); Российской академией наук (Г. Г. Онищенко); Институтом биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН (К. Г. Скрябин, Б. Б. Кузнецов, М. С. Сухачева, И. В. Яковлева); МГУ им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 2 ноября 2015 г.

3. Введены впервые.

© Роспотребнадзор, 2015

© Федеральный центр гигиены и
эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015

Содержание

I. Область применения	4
II. Методы количественного определения линий ГМ сои	4
III. Методы количественного определения линий ГМ кукурузы	7
IV. Метод приготовления растворов стандартных образцов для построения калибровочной прямой	11
V. Правила оформления протокола исследований	14

УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

2 ноября 2015 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Методы идентификации и количественного
определения новых линий ГМО 2-го поколения
в пищевых продуктах**

**Методические указания
МУК 4.2.3309—15**

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) определяют методы идентификации и количественного определения генно-инженерно-модифицированных организмов (далее – ГМО) растительного происхождения в пищевых продуктах и носят рекомендательный характер.

1.2. В настоящих МУК представлены методы, направленные на идентификацию и количественное определение рекомбинантной ДНК, характерной для уникальных трансформационных событий, для осуществления окончательной идентификации новых линий ГМО растительного происхождения.

1.3. Настоящие МУК предназначены для использования лабораториями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также другими испытательными лабораториями, аккредитованными в установленном порядке на проведение исследований продовольственного сырья и пищевых продуктов.

II. Методы количественного определения линий ГМ сои

2.1. Метод количественного определения сои линии FG72.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез лектина (*lectin1*), присущего для всех линий сои, и

области ДНК, специфичной для трансформационного события FG72 на границе генома сои и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ сои FG72 (кат. номер AOCS 0610-A3) – 99,9 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0707-A6).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК сои FG72:

MAE071 5'- AGA TTT GAT CGG GCT GCA GG-3'

SHA097 5'- GCA CGT ATT GAT GAC CGC ATT A-3'

TM325 FAM-5'- AAT GTG GTT CAT CCG TCT T-3'-MGBNFG

Праймеры для идентификации ДНК сои (*lectin1*):

KVM164 5'- CTTTCTCGCACCAATTGACA-3'

KVM165 5'- TCA AAC TCA ACA GCG ACG AC-3'

TM021 VIC -5'- CCA CAA ACA CAT GCA GGT TAT CTT GG-3'-

TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК сои FG72

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMAE071 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерSHA097 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Зонд TM325 (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК сои (*lectin1*)

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерKVM164 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерKVM165 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Зонд TM021 (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °C	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °C	15 с	нет	40
	60 °C	1 мин	да (Green, Yellow)	

2.2. Метод количественного определения сои линии SYHT0H2.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез лектина (*lectin1*), присущего для всех линий сои, и области ДНК, специфичной для трансформационного события SYHT0H2 на границе генома сои и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ сои SYHT0H2 (кат. номер AOCS 0411-D) – 99,9 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0411-B).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК сои SYHT0H2:

FE08316 forward primer 5'-GGGAATTGGGTACCATGCC-3'

FE08317 reverse primer 5'-TGTGTGCCATTGGTTTAGGGT-3'

FE08318 probe FAM-5'-CCAGCATGGCCGTATCCGCAA-3'-BHQ

Праймеры для идентификации ДНК сои (*lectin1*):

Lecfor2 5'-CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC-3'

GMO3-126 Rev 5'-GAAGGCAAGCCCATCTGCAAGCC-3'

Lec probe FAM-5'-CTTCACCTTCTATGCCCTGACAC-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК сои SYHT0H2

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	Праймер FE08316 forward primer (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	Праймер FE08317 reverse primer (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	FE08318 probe (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР c25 мМ MgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК сои (*lectin1*)

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерLecfor2(5 пкмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерGMO3-126 Rev (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Lec probe(5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Деионизированная вода	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °C	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °C	15 с	нет	45
	60 °C	60 с	да (Green)	

III. Методы количественного определения линий ГМ кукурузы

3.1. Метод количественного определения кукурузы линии MON89034.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена *hmgA*, присущего для всех линий кукурузы, и области ДНК, специфичной для трансформационного события MON89034 на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ кукурузы MON89034 (кат. номер AOCS 0906-E) – 99,4 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0906-A).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК кукурузы MON89034:

MON 89034 primer 1 5'-TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT-3'

MON 89034 primer 2 5'-CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA-3'

MON 89034 (Probe) FAM-5'-ATCCCCGGAATATGTT3'-MGBNFQ

Праймеры для идентификации ДНК кукурузы (*hmgA*):

hmg primer 1 5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'

hmg primer 2 5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'

hmg (Probe) FAM-5'-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК кукурузы MON89034

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMON 89034 primer 1 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	Праймер2MON 89034 primer 2 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	ЗондMON 89034 (Probe) (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР c25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деионизированная	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК кукурузы

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	Праймерhmgprimer 1 (5 пкмоль/мкл)	2,50
3	Праймерhmgprimer 2 (5 пкмоль/мкл)	2,50
4	Зонд hmg (Probe) (5 пкмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР c25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деионизированная	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °C	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °C	15 с	нет	45
	60 °C	60 с	да (Green)	

3.2. Метод количественного определения кукурузы линии 5307.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена, кодирующего синтез алкогольдегидрогеназы 1(*adh1 1*), присущей для всех линий кукурузы, и области ДНК, специфичной для трансформационного события 5307 на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ кукурузы 5307 (кат. номер AOCS 0411-D) – 99,88 % и ее традиционный аналог (кат. номер AOCS 0411-C).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК кукурузы 5307:
 5307i3' forward primer 5'-CAT GGC CGT ATC CGC AAT GTG-3'
 5307i3' reverse primer 5'-TGC ACC CTT TGC CAG TGG-3'
 5307i3'-s2 probe FAM-5'-ACC ACA ATA TAC CCT CTT CCC TGG
 GCC AG-3'-TAMRA

Праймеры для идентификации ДНК кукурузы (*adh1* 1):
 Zm *adh1* primer F5'-CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'
 Zm *adh1* primer R5'-CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC-3'
 Zm *adh1* probe VIC-5'-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-
 3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК кукурузы 5307

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	Праймер 5307i3' forward primer (5 пмоль/мкл)	2,50
3	Праймер 5307i3' reverse primer (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд 5307i3'-s2 probe (5 пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с 25 мМ MgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деионизированная	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК кукурузы

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	Праймер Zmadh1 primer (5 пмоль/мкл)	2,50
3	Праймер Zmadh1 primer (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд Zmadh1 probe (5 пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с 25 мМ MgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деионизированная	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °C	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °C	15 с	нет	40
	60 °C	60 с	да (Green, Yellow)	

3.3. Метод количественного определения кукурузы линии ТС 1507.

Метод основан на ПЦР в реальном времени с определением гена *hmgA*, присущего для всех линий кукурузы, и области ДНК, специфичной для трансформационного события ТС 1507 на границе генома кукурузы и элемента генетической конструкции.

Для построения калибровочной прямой используются стандартные образцы состава ГМ кукурузы ТС 1507 ERM-BF418a (< 0,1 % (m/m); ERM-BF418b (1,0 % (m/m); ERM-BF418c (9,9 % (m/m); ERM-BF418d (98,6 % (m/m).

Праймеры для идентификации рекомбинантной ДНК кукурузы ТС 1507:

- 1) MaiY-F15'-TAGTCTTCGGCCAGAATGG-3'
- 2) MaiY-R35'-CTTTGCCAAGATCAAGCG-3'
- 3) MaiY-S1FAM- 5'-TAACTCAAGGCCCTCACT CCG-3'-TAMRA

Праймеры для идентификации ДНК кукурузы (*hmgA*):

- 4) MaiJ-F25'-TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA-3'
- 5) mhmg-rev5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'
- 6) Mhmg-probeFAM- 5'-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-3'-TAMRA

Реакционная смесь для определения рекомбинантной ДНК кукурузы ТС 1507

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMaiY-F1 (5 пмоль/мкл)	2,50
3	ПраймерMaiY-R3 (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд MaiY-S1 (5 пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР c25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Taq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деонизированная	8,75
	Итого:	25,00

Реакционная смесь для определения ДНК кукурузы

№ п/п	Реактивы	Объем, мкл
1	Образец ДНК	5,00
2	ПраймерMaiJ-F2 (5 пмоль/мкл)	2,50
3	Праймерmhmg-rev (5 пмоль/мкл)	2,50
4	Зонд Mhmg-probe (5пмоль/мкл)	1,00
5	Буфер для ПЦР с25 мМMgCl ₂ (10X)	2,50
6	Смесь нуклеотидов (2 мМ)	2,50
7	Тaq-полимераза (5 единиц/мкл)	0,25
8	Вода деонизированная	8,75
	Итого:	25,00

Условия амплификации

Стадия	Температура	Время	Детекция	Циклы
Предварительная денатурация	95 °С	10 мин	нет	1
Амплификация	95 °С	15 с	нет	45
	60 °С	60 с	да (Green)	

IV. Метод приготовления растворов стандартных образцов для построения калибровочной прямой

4.1. Образец приготовления стандартов для построения калибровочной прямой на примере кукурузы MON89034.

4.1.1. Для построения калибровочной прямой необходимо приготовить образцы с 5,0; 1,0 и 0,1 %-м содержанием ГМ кукурузы MON89034. Для этого следует использовать стандартные образцы состава ГМ кукурузы MON89034 (кат. номер AOCS 0906-E), содержание ГМ кукурузы 99,4 %, и ее традиционного аналога (кат. номер AOCS 0906-A).

4.1.2. Приготовление 5 %-го образца: смешать 5,03 г муки ГМ кукурузы и 94,97 г муки ее традиционного аналога. Приготовление 1 %-го образца: смешать 2,0 г 5 %-й смеси ГМ кукурузы MON89034 и 8,0 г муки ее традиционного аналога. Приготовление 0,1 %-го образца: смешать 1,0 г 1,0 %-й ГМ кукурузы MON89034 и 9,0 г муки ее традиционного аналога.

4.1.3. Из полученных смесей выделить ДНК (выделение ДНК – глава IV МУК 4.2.2304—07), полученные растворы ДНК будут содержать ГМ ДНК в количестве 5,0; 1,0 и 0,1 % соответственно.

4.2. Расчет количества рекомбинантной ДНК на основании калибровочной прямой.

4.2.1. Образец расчета количества рекомбинантной ДНК на примере ГМ сои FG72.

Определить пороговый цикл для каждой ПЦР (C_t) по кривой амплификации. Рассчитать разность между C_t , специфичным для трансформационного события FG72 (линии сои FG72), и C_t , специфичным для гена *lec*. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяется по формуле:

$$w = 2^{-(\Delta C_{tsam} - \Delta C_{tref})} \times c_{ref}, \text{ где}$$

ΔC_{tsam} – разность между значениями C_t для трансформационного события FG72 или SYHT0H2 и гена *lec* в исследуемом образце;

ΔC_{tref} – разность между значениями C_t для трансформационного события FG72 или SYHT0H2 и гена *lec* в стандартном образце;

c_{ref} – концентрация стандартного образца.

Предел детекции метода составляет 0,01 %.

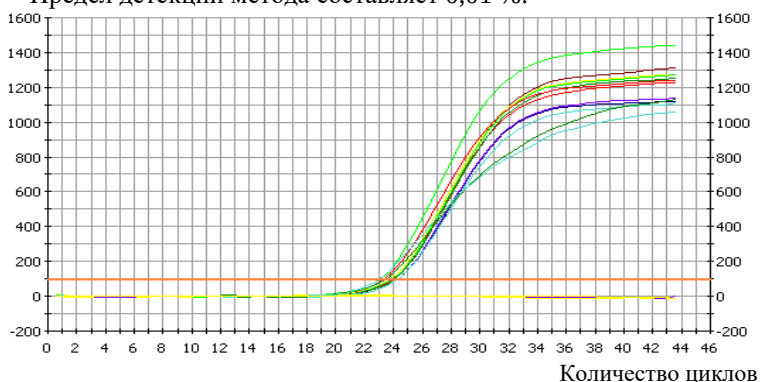


Рис. 1. Кривая зависимости величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для гена *lec*

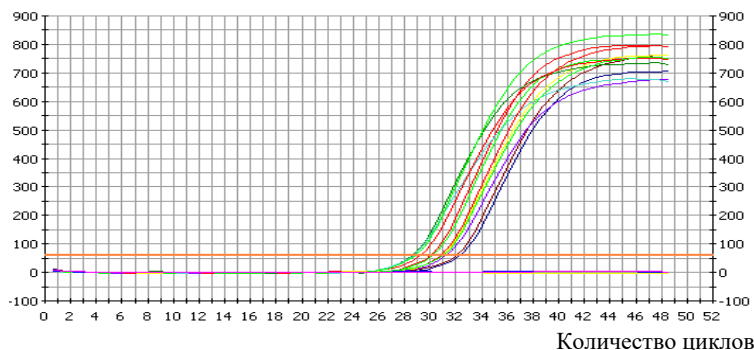


Рис. 2. Зависимость величины сигнала флуоресценции (Rn) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК

4.2.2. Образец расчета количества рекомбинантной ДНК на примере ГМ кукурузы MON89034.

Определить пороговый цикл для каждой ПЦР (C_t) по кривой амплификации. Рассчитать разность между C_t , специфичным для трансформационного события MON89034 (линии кукурузы MON89034), и C_t , специфичным для гена *hmgA*. Относительное количество рекомбинантной ДНК в пробе определяется по формуле, представленной в п. 4.2.1.

Предел детекции метода составляет 0,01 %.

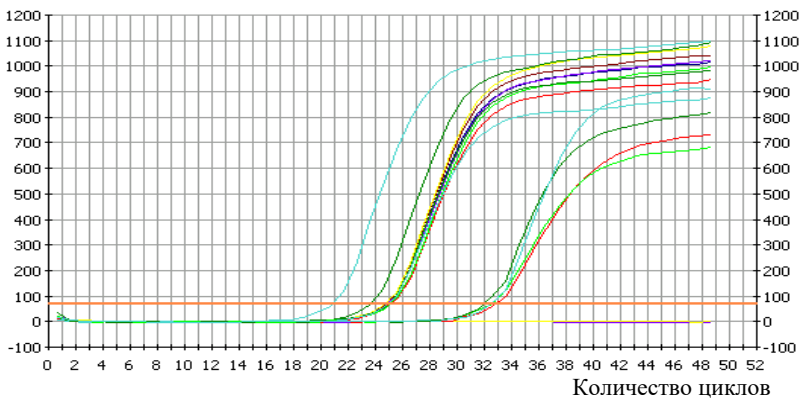


Рис. 3. Зависимость величины сигнала флуоресценции (R_n) от количества циклов ПЦР для гена *hmgA*

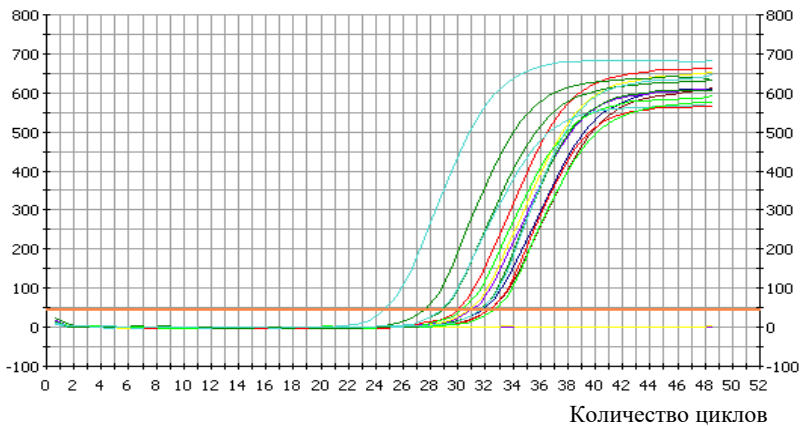


Рис. 4. Зависимость величины сигнала флуоресценции (R_n) от количества циклов ПЦР для рекомбинантной ДНК

V. Правила оформления протокола исследований

Протокол исследований должен содержать следующие пункты.

Название организации, проводившей анализ, адрес, контактный телефон.

Аттестат аккредитации, № __.

Наименование исследуемого образца.

Название организации заявителя.

Нормативная документация, в соответствии с которой проводилась оценка результатов (ТР ТС), ссылка на раздел нормативной документации, в соответствии с которым проводилось измерение.

Сведения об используемых средствах измерения и испытательном оборудовании.

Фактические и нормативные значения измеряемых показателей.

Протокол должен быть заверен печатью организации, проводившей анализ.

Пример.

№ п/п	Наименование определяемого вещества	Фактическое значение, погрешность (ед. измерения)	Нормативное значение показателя (ед. измерения)	Методы определения**	Примечание
1	Рекомбинантная ДНК, специфичная для soi линии 40-3-2	Не обнаружено (предел детекции метода 0,01 %) или Обнаружено (10 %)	Геномная доля, % *	МУК 4.2.2304—07	
* Нормативное значение отсутствует. Порог маркировки/технологически неустраняемая примесь: 0,9 %;					
** Указывается номер раздела МУК, в соответствии с которым проводилось измерение					

Выводы.

«В исследованном образце продукции **не выявлено** присутствие рекомбинантной ДНК soi линии 40-3-2»,
или

«В исследованном образце продукции **выявлено** присутствие рекомбинантной ДНК soi линии 40-3-2 в количестве 10 % в расчете на общую ДНК soi в образце».

Соя линии 40-3-2 разрешена для использования в пищевой промышленности и для реализации населению на территории Евразийского экономического союза.

Испытания (исследования) провели: должность и Ф.И.О. оператора, подписи.

Также необходимо указать, что результаты испытаний (исследований), представленные в данном Протоколе, относятся только к представленной пробе (образцу).