

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование  
Российской Федерации

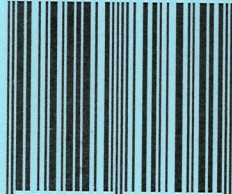
4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**Идентификация видовой принадлежности  
рыб семейства тресковых методом ПЦР  
с гибридизационно-флуоресцентной  
детекцией**

Методические указания  
МУК 4.2.3673—20

Издание официальное

ISBN 978-5-7508-1805-1



9 785750 818051

Москва • 2021

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

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

**Идентификация видовой принадлежности рыб  
семейства тресковых методом ПЦР  
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией**

**Методические указания  
МУК 4.2.3673—20**

ББК 48.1  
И29

И29 **Идентификация** видовой принадлежности рыб семейства тресковых методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией: Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021.—12 с.

ISBN 978–5–7508–1805–1

1. Разработаны ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (М. В. Зароченцев, Д. С. Кудрявцев), ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (Н. С. Мюге, А. А. Сергеев), ООО «ГенБит» (И. И. Гревцева, М. М. Никитин, П. А. Француз, А. Г. Голиков).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 14 декабря 2020 г.

3. Введены впервые.

ББК 48.1

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 20.01.2021

Формат 60x88/16

Тираж 100 экз.

Печ. л. 0,75  
Заказ 3

Федеральная служба по надзору  
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован  
Федеральным центром гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора  
117105, Москва, Варшавское ш., 19А  
Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 633-86-59

© Роспотребнадзор, 2021

## Содержание

I. Общие положения и область применения .....	4
II. Аналитические характеристики метода .....	5
III. Оборудование и реактивы .....	5
VI. Подготовка образцов для анализа .....	7
V. Выделение ДНК .....	7
VI. Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени .....	7
VII. Регистрация и интерпретация результатов .....	9
Приложение. Определяемые генетические элементы .....	11

## УТВЕРЖДАЮ

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

А. Ю. Попова

14 декабря 2020 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**Идентификация видовой принадлежности рыб  
семейства тресковых методом ПЦР  
с гибридизационно-флуоресцентной детекцией**

Методические указания  
МУК 4.2.3673—20

**I. Общие положения и область применения**

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУК) устанавливают методы идентификации рыб семейства тресковых (треска атлантическая (*Gadus morhua*), треска тихоокеанская (*Gadus macrocephalus*), пикша (*Melanogrammus aeglefinus*), путассу (*Micromesistius poutassou*), сайда (*Pollachius virens*), минтай (*Gadus chalcogrammus*), мерланг (*Merlangius merlangus*)) в продовольственном (пищевом) сырье и пищевых продуктах.

1.2. Представленные методы основаны на использовании полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, в том числе в формате свободно конфигурируемых ПЦР-матриц (включая предварительно подготовленные ПЦР-матрицы). Методы направлены на выявление специфических последовательностей ДНК в геноме тресковых рыб.

1.3. МУК предназначены для органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы лабораториями, осуществляющими исследования пищевых продуктов и продовольственного сырья.

1.4. МУК носят рекомендательный характер.

**II. Аналитические характеристики метода**

2.1. Аналитическая чувствительность метода составляет  $10^4$  копий ДНК в одном миллилитре раствора образца.

2.2. Аналитическая специфичность метода ПЦР в матричном формате аналогична аналитической специфичности ПЦР в классическом формате. Отсутствует положительная реакция в тестах с ДНК нецелевых объектов (ДНК близкородственных и других видов).

**III. Оборудование и реактивы**

3.1. Лаборатории, осуществляющие исследования, должны быть организованы в соответствии с методическими документами<sup>1</sup>, регламентирующими работу лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот.

3.2. Для проведения исследований используется следующее оборудование:

- амплификатор нуклеиновых кислот в режиме реального времени, обеспечивающий проведение термоциклирования в ячейках объемом до 1,5 мкл, ячейках планшета или в микропробирках объемом до 200 мкл;
- ламинарный бокс или бокс для ПЦР со встроенной системой УФ-облучения;

- общелабораторный холодильник с морозильником с температурой от плюс 3 °С до плюс 16 °С / минус 9 °С до минус 30 °С;

- микроцентрифуга настольная для пробирок конических полипропиленовых с крышкой объемом 1,5—2 мл (максимальное ускорение не менее 11000 g);

- аппарат для встряхивания типа «Вортекс» или микроцентрифуга «Вортекс» (максимальное ускорение не менее 450 g);

- термостат твердотельный для пробирок конических полипропиленовых с крышкой объемом 0,5 мл и 1,5—2 мл, диапазон температур – от плюс 20 °С до плюс 99 °С, количество гнезд – не менее 20 каждого типа, точность поддержания температуры 1 °С, разность температур между соседними ячейками – не более 0,5 °С;

- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

- гомогенизатор лабораторный (опционально);

- облучатель бактерицидный настенный;

- дозаторы механические с переменным объемом дозирования: 0,2—2,5 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью  $\pm 1,2\%$ ; 0,5—10,0 мкл с ша-

<sup>1</sup> МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

гом 0,01 мкл, с точностью  $\pm 0,8\%$ ; 2—20 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью  $\pm 0,8\%$ ; 20—200 мкл с шагом 0,1 мкл, с точностью  $\pm 0,6\%$ ; 100—1000 мкл с шагом 1 мкл, с точностью  $\pm 3\%$ ;

– дозатор электронный с переменным объемом дозирования 0,5—10,0 мкл, обеспечивающий функцию диспенсирования (повторного дозирования, опционально).

**Примечание.** Допускается применение оборудования с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.

3.3. Для проведения исследований используются следующие расходные материалы:

– пробирки микроцентрифужные конические полипропиленовые с крышкой по типу «Эппендорф» вместимостью 1,5 см<sup>3</sup>, 0,5 см<sup>3</sup>, 0,2 см<sup>3</sup>;

– наконечники одноразовые с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до 10; 20; 100; 200; 1000 мкл;

– при использовании микрочипового формата: ПЦР-матрицы (микрочипы) с иммобилизованными реактивами, подготовленные для выявления и идентификации рыб семейства тресковые (треска атлантическая (*Gadus morhua*), треска тихоокеанская (*Gadus macrocephalus*), пикша (*Melanogrammus aeglefinus*), путассу (*Micromesistius poutassou*), сайда (*Pollachius virens*), минтай (*Gadus chalcogrammus*), мерланг (*Merlangius merlangus*)), в том числе в их смесях.

Определяемые генетические элементы и используемые специфические реактивы (праймеры, ДНК-зонды) для каждой ПЦР-тест-системы представлены в приложении к настоящим МУК.

3.4. Для проведения исследований используются следующие реактивы:

– набор реактивов для выделения ДНК из пищевых продуктов и продовольственного сырья;

– тест-системы для выявления и идентификации рыб семейства тресковых, в том числе в виде коммерческих готовых наборов реактивов;

– буфер для ПЦР с MgCl<sub>2</sub> концентрированный (10×);

– вода деионизованная;

– герметизирующая жидкость для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе термоциклирования (минеральное масло, полиметилсилоксан).

## VI. Подготовка образцов для анализа

4.1. Отбор проб пищевых продуктов и продовольственного сырья для выполнения лабораторных исследований проводят в соответствии с ГОСТ 31904.

4.2. При исследовании тушек (в том числе их фрагментов) или филе следует учитывать особенности добычи и улова рыбы, в частности вероятность контаминации чужеродной ДНК при контакте с другими видами рыб в процессе добычи и транспортировки. Для минимизации вероятности контаминации рекомендуется отбирать образец для последующего анализа из участков тушки/филе, не контактировавших с внешней средой (по возможности исключить отбор кожи, плавников, чешуи и т. п.).

## V. Выделение ДНК

5.1. Для выделения ДНК используют готовые наборы реактивов, предназначенные для работы с пищевыми продуктами и продовольственным сырьем. Выделение ДНК осуществляется в соответствии с протоколом (инструкцией по применению), рекомендованным производителем.

5.1.1. Для упрощения процедуры выделения ДНК рекомендуется применение методов, основанных на использовании сорбентов.

5.1.2. Не допускается использовать методы выделения ДНК, основанные на применении комбинации реагентов «гуанидин – фенол – хлороформ».

5.2. Полученный препарат ДНК следует хранить при плюс 4 °С (кратковременное хранение, не более 6 ч) или в морозильной камере при минус 20 °С (длительное хранение, до 1 года).

## VI. Проведение амплификации с детекцией в режиме реального времени

6.1. Для проведения анализа рекомендуется использовать коммерческие наборы реактивов (подготовленные ПЦР-матрицы). В этом случае подготовку ПЦР-смесей и амплификацию необходимо проводить в соответствии с инструкцией производителя тест-систем (ПЦР-матриц).

6.2. В случае использования самостоятельно подготовленных ПЦР-матриц:

6.2.1. Подготовить реакционные объемы (пробирки, планшеты) в количестве  $n \times m$ , где  $n$  – количество исследуемых образцов,  $m$  – количество тест-систем в ПЦР-матрице (включая контрольные образцы).

6.2.2. Приготовить ПЦР-смесь объемом  $(n \times m + 1) \times 16$  мкл, где  $n$  – количество исследуемых образцов,  $m$  – количество тест-систем в ПЦР-матрице (включая контрольные образцы). Пробирки с ПЦР-смесью в

процессе приготовления должны находиться при температуре 0 °С (в емкости со смесью льда и воды или охлаждающем штативе). Состав ПЦР-смеси приведен в табл. 1.

Таблица 1

Состав ПЦР-смеси (мастер-микса) на 16 мкл

Компонент	Концентрация	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции (25 мкл)
Смесь дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ)	2,5 ммоль/дм <sup>3</sup> каждого дНТФ	2,5	250 мкмоль/дм <sup>3</sup>
Прямой праймер	5 пмоль/см <sup>3</sup>	2	0,4 пмоль/см <sup>3</sup>
Обратный праймер	5 пмоль/см <sup>3</sup>	2	0,4 пмоль/см <sup>3</sup>
ДНК-зонд	2,5 пмоль/см <sup>3</sup>	2	0,2 пмоль/см <sup>3</sup>
ПЦР-буфер с MgCl <sub>2</sub>	10х	2,5	1х
Термостабильная ДНК-полимераза (Taq) с горячим стартом	5 Е/мкл	0,5	2,5 Е/реакция
Вода деионизованная	—	4,5	—

6.2.3. В каждый элемент ПЦР-матрицы (пробирку, ячейку планшета) внести по 16 мкл ПЦР-смеси, приготовленной по п. 6.2.2. В реакционные объемы, предназначенные для идентификации образцов, внести по 9 мкл ДНК исследуемых образцов. В реакционные объемы, предназначенные для отрицательных контрольных образцов, внести по 9 мкл деионизованной воды.

6.2.4. Установить подготовленные ПЦР-матрицы (пробирки, планшеты) в амплификатор нуклеиновых кислот в соответствии с инструкцией по эксплуатации. С использованием управляющего программного обеспечения для амплификатора внести программу амплификации в соответствии с табл. 2. Для каждой тест-системы установить соответствующий канал регистрации флуоресцентного сигнала. Запустить анализ.

Таблица 2

Программа амплификации

Этап	Температура, °С	Продолжительность, с*	Количество повторов (циклов)
Первичная денатурация	94	180	1
Денатурация	94	5	45
Отжиг праймеров + элонгация	60	30	

Примечание. \*Продолжительность этапов не зависит от формата проведения ПЦР

## VII. Регистрация и интерпретация результатов

7.1. Регистрация результатов амплификации на большинстве современных моделей амплификаторов происходит автоматически в режиме реального времени и отображается в виде графиков зависимости флуоресцентного сигнала от номера цикла ПЦР. Расчет значений пороговых циклов производится в соответствии с руководством к программному обеспечению амплификатора.

7.2. Указанные ниже критерии отнесения конкретного образца к содержащим или не содержащим видоспецифичную ДНК являются единственными для любого используемого формата ПЦР (пробирки, планшеты, микрочипы).

7.3. Результат анализа считается достоверным, если выполнены следующие условия:

7.3.1. для внутреннего контрольного образца значение порогового цикла не превышает 25,00;

7.3.2. для отрицательных контролей ПЦР (К-) флуоресцентный сигнал не регистрируется (не превышает порогового значения);

7.3.3. в случае если хотя бы одно из условий 7.3.1—7.3.2 не выполняется, анализ необходимо повторить.

7.4. Видоспецифичная ДНК рыб семейства тресковых (треска атлантическая (*Gadus morhua*), треска тихоокеанская (*Gadus macrocephalus*), пикша (*Melanogrammus aeglefinus*), путассу (*Micromesistius poutassou*), сайда (*Pollachius virens*), минтай (*Gadus chalcogrammus*), мерланг (*Merlangius merlangus*)) обнаружена, если для соответствующей пробирки/реактора значение порогового цикла не превышает 30.

7.5. Видоспецифичная ДНК рыб семейства тресковых не обнаружена, если для соответствующей пробирки/реактора значение порогового цикла превышает 30 или флуоресцентный сигнал не регистрируется.

7.6. Интерпретацию результатов анализа проводят согласно табл. 3.

7.6.1. При применении готовых наборов реагентов (тест-систем) интерпретацию результатов проводят в соответствии с инструкцией по применению соответствующего набора.

Тест-системы Видо-специфичная ДНК	Треска атлантическая	Треска тихоокеанская	Треска тихоокеанская	Минтай	Мерланг	Путассу	Сайда	Пикша	ВКО	К-	Результат
Трески атлантической	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК трески атлантической
Трески тихоокеанской	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК трески тихоокеанской
Минтай	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК минтая
Мерланга	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК мерланга
Путассу	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК путассу
Сайды	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК сайды
Пикши	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК пикши
	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК путассу
	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 30$	$C_1 > 30$	$C_1 \leq 25$	Не регистрируется	Обнаружена ДНК сайды

Примечание: «+» – флуоресцентный сигнал регистрируется; «-» – отсутствие сигнала флуоресценции.

### Определяемые генетические элементы

Вид/род	Мишень	Номер в базе данных GenBank <sup>2</sup> и последовательности специфических олигонуклеотидов (праймеров и зондов)
1	2	3
Треска атлантическая ( <i>Gadus morhua</i> )	Ген пантофизина (panI)	AF288943.1 PRF*: CAATGTTAATGTTTCTCCTACTTT PRR*: TGACGGAAGTGTAGTGGCAA Probe*: ROX-CAGCATCCTTACCSAAGTCCSTACCC-BHQ2
Треска тихоокеанская ( <i>Gadus macrocephalus</i> )	Ген субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы (ND2)	EU729423.1 PRF: ATGTGTCAGATTATACCAAGTTAATTC PRR: GTTGGTTAAATTTGTATAACAAGGA Probe: FAM-TCTGGGCGTGACCTCAACACATA-BHQ1
Пикша ( <i>Merlangius aeglefinus</i> )	Ген АТФазы 6 (АТФ6)	DQ010963.1 PRF: AATTAGGCTTAGCTGTTC PRR: GAATTAGAGCTGTAGGGGTG Probe: ROX-TAGCAACTGTTCTTATTGGGAATACGAA-BHQ2
Путассу ( <i>Microstomus roulei</i> )	Ген пантофизина (panI)	AU292496.1 PRF: ACTCTCCTGGTTGATTGATATTT PRR: CTATACAGGTGTGGAAGCC Probe: FAM-CTTGTCTTAGATTGATGCAGCATT-BHQ1
Сайда ( <i>Pollachius virens</i> )	Ген пантофизина (panI)	AU292491.1 PRF: GTTTGTGCTATCATACCCATC PRR: GGACTTTGTAAGAAATGCTGC Probe: ROX-CTCCTAAATCGTGGCTGTGTA-BHQ2

<sup>2</sup> Официальный сайт <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Продолжение прилож.

1	2	3
Минтай ( <i>Gadus chalcogrammus</i> )	Ген пантофизина (panI)	AY292495.1 PRF: GCAATGTTAATGTTTCTCCTACT PRR: AGTTAGTTGCCAATAAGGAAAG Probe: FAM-CAGCATCTTACACAGTCCCTACCT-BHQ1
Мерланг ( <i>Merlangius merlangus</i> )	Ген родопсина (rhod)	EU492056.1 PRF: TACACCCGGCTGAGG PRR: GTAGATGGACGAGGACTTGG Probe: FAM-AGATGGGACCCGAAAGACGCTG-BHQ1
Внутренний контрольный образец	Ген цитохрома b (cytb) <i>P. opca</i>	KM236783.1 PRF: GTAGACAAAAGCCACCTAACACG PRR: GTAGAAACACCCCTAGATCACCATCG Probe: ROX-GGTCTCTCCTAGCCATACASATASAC-BHQ2 Плазмида со вставкой tatatGTA-GACAAAAGCCACCTAACACCGtatatatGGTCTCTCCTAGCCATACASATACatatatataCGATGGTGAATCTAGGGGT-GTCTACatata
<b>Примечание.</b> *PRF – прямой праймер, PRR – обратный праймер, Probe – ДНК-зонд. Последовательности приведены в направлении 5'-3'.		