



**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
(Минсельхоз России)

П Р И К А З

от 4 апреля 2019 г.

№ 169

Москва

Об утверждении Методики производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения

В соответствии с пунктом 13 Правил государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию, ввозимую на территорию Российской Федерации, утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 23 сентября 2013 г. № 839 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2013, № 39, ст. 4991; 2014, № 25, ст. 3317; 2017, № 28, ст. 4145; 2018, № 6, ст. 896; № 41, ст. 6260), п р и к а з ы в а ю:

Утвердить прилагаемую Методику производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения.

Министр

Д.Н. Патрушев

УТВЕРЖДЕНА
приказом Минсельхоза России
от 04.04.2019 г. № 169

М Е Т О Д И К А
производства молекулярно-генетического исследования
генно-инженерно-модифицированных организмов,
используемых для производства лекарственных средств
для ветеринарного применения

1. Настоящая Методика устанавливает порядок проведения молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения (далее – исследование, ГМО соответственно).

2. Исследование проводится организацией (испытательной лабораторией), аккредитованной в национальной системе аккредитации, с областью аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике.

3. В рамках исследования осуществляется анализ представленных юридическим лицом, осуществляющим на территории Российской Федерации генно-инженерную деятельность в целях создания ГМО (далее – заявитель), документов и данных:

- а) наименования ГМО с указанием его таксономического статуса;
- б) полного наименования, места нахождения, идентификационного номера налогоплательщика (ИНН) заявителя;
- в) полного наименования и места нахождения юридического лица либо фамилии, имени, отчества (при наличии), места жительства индивидуального предпринимателя – изготовителя образцов ГМО;
- г) вида предполагаемого целевого использования ГМО;
- д) сведений об исходном организме-реципиенте (таксономическая характеристика с указанием метода идентификации; источник выделения штамма: субстрат, географический пункт, дата выделения; методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество (при наличии)), ссылка на использованные определители);
- е) сведений о трансформационном событии в виде кода, сформированного согласно Общероссийскому классификатору трансформационных событий;
- ж) информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГМО, паспорта штамма ГМО (для депонированных штаммов ГМО) либо информации о культурально-морфологических, физиолого-биохимических

(ферментативных), антигенных, биологических свойствах и генетических особенностях штамма ГМО; условиях культивирования: наименованиях питательных сред, рН среды, температуре и продолжительности выращивания, сроке хранения и периодичности пересева культуры штамма ГМО в нативной форме; о применяемом способе и условиях хранения штамма ГМО: в случае лиофилизации указывается продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, режим высушивания, температура хранения, срок хранения; в случае криоконсервации указывается продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, скорость замораживания (град/мин), температура хранения, срок хранения; о диссоциации культуры в зависимости от метода хранения (описание морфологических типов колоний на конкретной среде с подробным описанием типа колонии, сохраняющего полезный или диагностический признак); о среде, на которой заявителем предоставляется штамм ГМО; о количестве, дате приготовления и сроке годности образцов штамма ГМО (в случае непредставления информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГМО, паспорта штамма ГМО);

з) описания структуры, внесенной или удаленной генетической конструкции и места ее локализации, характеристик встроенных или измененных генов;

и) информации о генетической модификации: описание метода модификации, структуры вектора, структуры вставки, расположения рекомбинантной ДНК (хромосома, плаزمид, мобильные элементы), включая фланкирующие последовательности, включения в состав мобильных генетических элементов;

к) информации об организмах-донорах вносимых генов (с указанием группы патогенности при наличии);

л) описания методики, позволяющей идентифицировать ГМО, в том числе описания нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров, зондов и условий полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР);

м) регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГМО, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГМО, в отношении которого проводится исследование (в случае, если ГМО создан на основе иного (иных) ГМО);

н) регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГМО для иного целевого использования (при наличии);

о) информации о регистрации ГМО за рубежом (при наличии);

п) данных полногеномного секвенирования ГМО (при наличии).

Заявителем ГМО для исследования предоставляются образцы ГМО и исходного организма-реципиента.

4. В рамках исследования осуществляются следующие испытания предоставленных заявителем образцов ГМО и исходного организма-реципиента:

а) проверка (валидация) методики идентификации ГМО, в том числе оценка чувствительности и специфичности данной методики в соответствии с критериями эффективности, указанными в таблице № 1 приложения к настоящей Методике;

б) подтверждение присутствия (отсутствия) заявленной генетической модификации в геноме ГМО;

в) подтверждение присутствия (отсутствия) маркерных и селективных генов в геноме ГМО, указанных в таблице № 2 приложения к настоящей Методике;

г) полногеномное секвенирование ГМО, который содержится в продукции в жизнеспособном виде (в случае непредставления заявителем ГМО данных полногеномного секвенирования ГМО, представляющего собой плазмиду, вирус (бактериофаг), бактерию или одноклеточное простейшее, животное, гриб), проведенного с использованием методики полногеномного секвенирования, соответствующей критериям эффективности, указанным в таблице № 3 приложения к настоящей Методике.

5. Полногеномное секвенирование ГМО проводится с использованием методики полногеномного секвенирования, соответствующей критериям эффективности, указанным в таблице № 3 приложения к настоящей Методике.

6. Результаты исследования оформляются заключением о результатах исследования, составляемым на основании протоколов испытаний, которое должно содержать:

наименование заключения;

полное наименование и место нахождения организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение исследования;

наименование ГМО с указанием его таксономического статуса;

полное наименование, место нахождения, идентификационный номер налогоплательщика (ИНН) заявителя;

полное наименование и место нахождения юридического лица либо фамилия, имя, отчество (при наличии), место жительства индивидуального предпринимателя – изготовителя образцов ГМО;

вид предполагаемого целевого использования ГМО;

место депонирования и коллекционный номер (указывается для депонированных штаммов ГМО);

сведения о трансформационном событии в виде кода, сформированного согласно Общероссийскому классификатору трансформационных событий;

регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГМО, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГМО, в отношении которого проведено исследование (в случае если ГМО создан на основе иного (иных) ГМО);

регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГМО для иного целевого использования (при наличии);

сведения о регистрации ГМО за рубежом (при наличии);

оценку полноты представленных заявителем документов и данных;

краткое содержание представленных заявителем документов и данных;

описание представленных заявителем образцов ГМО и исходного организма-реципиента с указанием их количества, а также оценку их пригодности для проведения исследования;

выводы о результатах исследования: о молекулярно-генетической структуре ГМО, об отсутствии или наличии не заявленных генетических конструкций, об эффективности метода идентификации ГМО, сведения о соответствии генетической модификации природным (естественным) процессам;

фамилии, имена, отчества (при наличии), должности, места работы, ученые степени (при наличии) лиц, проводивших исследование;

дату и номер заключения;

подпись руководителя организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение исследования.

7. К заключению о результатах исследования должны прилагаться протоколы испытаний, на основании которых оно составлено, подписанные лицами, проводившими испытания.

8. В случае если заявителем не представлены документы и данные, предусмотренные настоящей Методикой, и (или) образцы ГМО и исходного организма-реципиента, пригодные для проведения исследований, в количестве, необходимом для проведения исследований, исследование не проводится. Заявителю должен быть выдан мотивированный отказ в проведении исследования, подписанный руководителем организации (испытательной лаборатории), аккредитованной в национальной системе аккредитации, с областью аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике, в которую обратился заявитель для проведения исследования.

Приложение
к Методике производства
молекулярно-генетического
исследования генно-инженерно-
модифицированных организмов,
используемых для производства
лекарственных средств для
ветеринарного применения

Таблица № 1. Критерии эффективности методики идентификации ГМО

| № п/п | Характеристика | Описание характеристики | Критерий | Методы оценки критерия |
|-------|----------------------|---|---|--|
| 1 | Специфичность ПЦР | Способность ПЦР-тест-системы выявлять только целевую нуклеиновую кислоту (далее – НК) | ПЦР-тест-система должна выявлять целевую НК. ПЦР-тест-система не должна давать ложноположительных результатов, в том числе выявлять НК близкородственных и неродственных биологических видов, в 100% проводимых исследований | Для оценки специфичности используют контрольные панели образцов. В состав панели входят образцы, содержащие целевую НК и не содержащие целевую НК |
| 2 | Чувствительность ПЦР | Наименьшее содержание копий целевой НК, которое может быть определено с использованием данной ПЦР-методики, в первую очередь зависит от свойств используемых праймеров и зондов | Чувствительность должна быть не ниже 100 копий целевой НК, например, плазмидной, в одной ПЦР | Проводят исследования ряда десятикратных разведений целевой плазмидной НК с известной концентрацией в двух повторах каждое. Определяют максимальное разведение, при котором НК воспроизводимо выявляется (в двух повторах) |

| № п/п | Характеристика | Описание характеристики | Критерий | Методы оценки критерия |
|-------|-------------------|--|---|--|
| 3 | Эффективность ПЦР | Характеризует прирост матрицы на каждом цикле амплификации | Эффективность ПЦР должна быть не ниже 90%. Это соответствует значению наклона линейной области зависимости C_t от логарифма концентрации ДНК матрицы (slope): не ниже 3,6 (приемлем диапазон slope 3,1 – 3,6) | Для оценки эффективности ПЦР проводят амплификацию с рядом десятикратных разведений целевой плазмидной НК (пункт 2 настоящей таблицы) в двух повторах каждое. Строят график зависимости C_t от логарифма концентрации НК матрицы. Определяют наклон линейной области (slope). Эффективность ПЦР оценивают по уравнению: $E = [10(-1/slope)] - 1$ В идеальном случае – при удвоении количества ПЦР продукта за один цикл: $E = 100\%$, (slope = -3,32) |

| № п/п | Характеристика | Описание характеристики | Критерий | Методы оценки критерия |
|-------|---|--|---|--|
| 4 | Предел обнаружения ПЦР-тест-системы (LOD) | Отражает минимальное количество биологического искомого объекта в исследуемом образце, которое может достоверно обнаружить данный метод | Чем меньше искомого биологического объекта способен выявить метод, тем выше его чувствительность. Определяется экспериментально, но должен составлять не более 0,1% | Готовят ряд модельных образцов с разным содержанием целевой матрицы. Готовят образцы целевого ГМО-ингредиента (от 5% до 0,001% содержания) в соответствующей матрице. Исследуют приготовленную панель с использованием ПЦР-методики. Определяют минимальное содержание ГМО-ингредиента в тотальной НК организма, при котором ГМО воспроизводимо выявляется (в десяти повторях) |
| 5 | Предел количественного определения (LOQ) | Наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть оценено с использованием методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной прецизионностью | Для методик ГМО предел должен быть не более 0,1%. На пределе чувствительности относительное стандартное отклонение (RSD) для методик ГМО не должно превышать 20%. Истинное значение измеряемой величины должно входить в полученный при измерениях доверительный интервал | Исследуют 10 повторов 0,1% ГМО-стандарта по ПЦР-методике. Рассчитывают среднее значение содержания ГМО в образце и относительное стандартное отклонение (RSD). Сравнивают рассчитанное стандартное отклонение (RSD) с критерием 20%. Также оценивают, входит ли истинное значение в доверительный интервал полученного среднего значения |

| № п/п | Характеристика | Описание характеристики | Критерий | Методы оценки критерия |
|-------|---------------------------------------|--|---|--|
| 6 | Аналитическая область (dynamic range) | Интервал определяемых аналитических характеристик, в котором получаемые результаты имеют приемлемый уровень правильности и прецизионности. Для ГМО-методик обычно приемлем диапазон 0,1% – 5% | Диапазон 0,1% – 5% ГМО экспериментальных данных, должен удовлетворять линейной модели (пункт 7 настоящей таблицы) | Проводят исследования образцов с различным содержанием ГМО. Оценивают линейность зависимости аналитического сигнала |
| 7 | Линейность | Наличие линейной зависимости аналитического сигнала в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Оценивается как R^2 – коэффициент корреляции, определяющий верность модели линейной зависимости Ct от логарифма концентрации калибровочных образцов | R^2 -коэффициент для калибровочных образцов должен быть не менее 0,98% | Исследуют в двух повторах 0,1%, 1,0% и 5,0% калибровочные ГМО-стандарты по ПЦР-методике. Строят калибровочную прямую (dCt от lgC), оценивают коэффициент корреляции данных с линейной зависимостью (R^2) |

| № п/п | Характеристика | Описание характеристики | Критерий | Методы оценки критерия |
|-------|----------------|---|---|---|
| 8 | Правильность | Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное | Методика дает корректные результаты, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике | Готовят образцы из калибровочных стандартов 0,1%, 1,0% и 5,0% с добавлением матриц различного происхождения (для этого смешивают стандарты с другими ингредиентами, сухим молоком, мясным фаршем, рыбной мукой). Исследуют образцы по ПЦР-методике в двух повторях. Оценивают, входит ли истинное значение в диапазон погрешности полученного среднего значения для каждого образца |

При использовании методики, основанной на ПЦР, исследование включает последовательные процессы: подготовку проб, выделение нуклеиновых кислот из образцов, амплификацию заданных фрагментов нуклеиновых кислот, детекцию продуктов амплификации, анализ и интерпретацию результатов.

Таблица № 2. Основные маркерные и селективные гены, являющиеся составляющими частями генно-инженерных конструкций

| Мишень | Описание |
|-----------------|---|
| Ген LacZ | Кодирует фермент β -галактозидазу. Используется в векторных плазмидных конструкциях (pCR2.1 TOPO, pVIK112, pBSKSII и других), включает область полилинкера для клонирования рекомбинантных генов. При наличии данного фермента бесцветный субстрат X-gal превращается в окрашенный продукт, бактериальные колонии, экспрессирующие LacZ, имеют голубой цвет |
| Ген gfp | Ген зеленого флуоресцентного белка используется в ряде векторных плазмид для генно-инженерных манипуляций (pKEN-gfpmut2, pRK415-gfp) в качестве светящейся метки |
| Ген amp | Кодирует устойчивость к ампициллину, используется в ряде векторных плазмид для селекции по антибиотикоустойчивости (pBR322, pUC18, pBSKSII, pET, pCR2.1 TOPO) |
| Ген Km | Кодирует устойчивость к канамицину, используется в ряде векторных плазмид для селекции по антибиотикоустойчивости (pVIK112, pMC212) |
| Ген tetO | Кодирует устойчивость к тетрациклину, используется в ряде векторных плазмид для селекции по антибиотикоустойчивости (pBR322) |
| F1 ori | Ориджин репликации плазмид (pBSKSII, pKEN-gfpmut2, pCR2.1 TOPO) |
| Транспозон Tn7L | Фрагмент обеспечивает транспозицию рекомбинантных генов из плазмид в геном (pRK415-gfp) |
| Ген ermC | Кодирует устойчивость к эритромицину, плазмидные векторы |
| Ген cat | Кодирует устойчивость к хлорамфениколу, плазмидные векторы |
| R6K ori | Ориджин репликации плазмид (pVIK112) |

Таблица № 3. Критерии эффективности методики полногеномного секвенирования

| Этап анализа | Характеристика | Описание характеристики | Критерий |
|---|--|--|---|
| Подготовка библиотеки для секвенирования | Концентрация геномной ДНК | | Не менее 0,2 нг/мкл |
| | Размер фрагментов ДНК | Распределение фрагментов по длинам, устанавливается электрофоретически | Распределение в диапазоне 250 – 1000 п.н. Максимум распределения 300 – 500 п.н. |
| Проведение массового параллельного секвенирования | Распределение качества идентификации нуклеотидов | $Q = -10 \log_{10} p$, где p – вероятность неправильного определения нуклеотида | $Q > 20$, то есть вероятность ошибки не более 0,01 |
| | Среднее качество прочтения | | $Q > 25$ |
| | Служебные последовательности | Наличие служебных последовательностей (адаптеров, индексов) в прочтении | Должны отсутствовать |
| | Покрытие чтения | Число чтений, содержащих определенный нуклеотид последовательности генома | Не менее десятикратного покрытия |
| | Представленность нуклеотидов в каждом цикле | Максимальное отклонение между А и Т или G и С | Не более 20% в любой позиции |
| | GC-состав на прочтение | Сумма отклонений от ожидаемого распределения | Не более 30% прочтений |