

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ**

**ПРИКАЗ**

Москва

**4 апреля 2019 г.**

**№ 169**

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

Зарегистрирован Минюстом России 29 мая 2019 г.

Регистрационный № 54775

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), приказываю:

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 4 апреля 2019 года № 169

**МЕТОДИКА**  
**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 посева 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 - ПНР);

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**

N 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	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

		очередь зависит от свойств используемых праймеров и зондов		каждое. Определяют максимальное разведение, при котором НК воспроизводимо выявляется (в двух повторах)
3	Эффективность ПЦР	Характеризует прирост матрицы на каждом цикле амплификации	Эффективность ПЦР должна быть не ниже 90%. Это соответствует значению наклона линейной области зависимости Ct 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 Ct 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)
4	Предел обнаружения ПЦР-тест-системы (LOD)	Отражает минимальное количество биологического искомого объекта в исследуемом образце, которое может достоверно	Чем меньше искомого биологического объекта способен выявить метод, тем выше его чувствительность. Определяется экспериментально, но	Готовят ряд модельных образцов с разным содержанием целевой матрицы. Готовят образцы целевого ГМО-ингредиента (от 5%

		обнаружить данный метод	должен составлять не более 0,1%	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 повторах)
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
6	Аналитическая область (dynamic range)	Интервал определяемых аналитических	Диапазон 0,1% - 5% ГМО экспериментальных данных, должен	Проводят исследования образцов с

		<p>характеристик, в котором получаемые результаты имеют приемлемый уровень правильности и прецизионности. Для ГМО-методик обычно приемлем диапазон 0,1% - 5%</p>	<p>удовлетворять линейной модели (пункт 7 настоящей таблицы)</p>	<p>различным содержанием ГМО. Оценивают линейность зависимости аналитического сигнала</p>
7	Линейность	<p>Наличие линейной зависимости аналитического сигнала в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Оценивается как <math>R_2</math>- коэффициент корреляции, определяющий верность модели линейной зависимости <math>C_t</math> от логарифма концентрации калибровочных образцов</p>	<p><math>R_2</math> - коэффициент для калибровочных образцов должен быть не менее 0,98%</p>	<p>Исследуют в двух повторах 0,1%, 1,0% и 5,0% калибровочные ГМО-стандарты по ПЦР-методике. Строят калибровочную прямую (<math>dC_t</math> от <math>IgC</math>), оценивают коэффициент корреляции данных с линейной зависимостью (<math>R_2</math>)</p>
8	Правильность	<p>Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное</p>	<p>Методика дает корректные результаты, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике</p>	<p>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 повторах. Оценивают, входит</p>

				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 б-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

	ГС-состав на прочтение	Сумма отклонений от ожидаемого распределения	Не более 30% прочтений
--	------------------------	--	------------------------