
**Продукты пищевые. Методы анализа
для обнаружения генетически
модифицированных организмов и
полученных из них продуктов. Методы,
основанные на количественном
определении нуклеиновых кислот**

*Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid
based methods*

ISO 21570:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 21570:2005(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe — торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованные для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 21570:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2005

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	v
Введение	vi
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	1
4 Принцип	2
4.1 Общие положения	2
4.2 Амплификация, обнаружение и подтверждение продуктов PCR	2
4.3 Количественное определение продуктов PCR	2
5 Реактивы	2
6 Аппаратура и оборудование	2
7 Руководящие указания, касающиеся процедуры	3
7.1 Общие положения	3
7.2 Стабильность целевой последовательности	3
7.3 Калибровка анализа	3
7.4 Соображения относительно количественного определения	3
7.5 Требования к обеспечению качества	4
8 Интерпретация	4
9 Выражение результатов	5
10 Протокол испытания	5
Приложение А (информативное) Методы, специфические для целевого таксона	6
A.1 Метод, специфический для целевого таксона, для определения абсолютного количественного содержания DNA гена <i>adh1</i> из кукурузы с использованием метода PCR в реальном времени	6
Приложение В (информативное) Методы скрининга	12
B.1 Метод скрининга для определения относительного количественного содержания DNA 35S-промотора сои линии GTS 40-3-2 с использованием PCR в реальном времени	12
Приложение С (информативное) Методы, специфические для конструкции	20
C.1 Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 с использованием PCR в реальном времени (Метод 1)	20
C.2 Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 с использованием PCR в реальном времени (Метод 2)	27
C.3 Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA кукурузы Event176 с использованием PCR в реальном времени	34
C.4 Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA сои линии GTS 40-3-2 с использованием PCR в реальном времени	41
C.5 Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA кукурузы линии MON 810 с использованием PCR в реальном времени	49
C.6 Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA кукурузы линии Event176 с использованием PCR в реальном времени	57

C.7	Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA кукурузы линии Vt11 с использованием PCR в реальном времени.....	65
C.8	Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA кукурузы линии GA21 с использованием PCR в реальном времени	73
C.9	Метод, специфический для конструкции, для количественного определения содержания DNA кукурузы линии T25 с использованием PCR в реальном времени	81
Приложение D (информативное) Методы, специфические для трансформационного события		89
D.1	Метод, специфический для трансформационного события, для абсолютного и относительного количественного определения содержания кукурузы линии Vt11 с использованием PCR в реальном времени	89
D.2	Метод, специфический для трансформационного события, для относительного количественного определения содержания DNA кукурузы линии MON 810 с использованием PCR в реальном времени	96
Библиография		102

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21570:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, то ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами Директив ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов заключается в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

Международный стандарт ISO 21570 подготовлен Европейским комитетом по стандартизации (CEN) Технического комитета CEN/TC 275, *Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы*, в сотрудничестве с Техническим комитетом ISO/TC 34, *Продукты пищевые*, в соответствии с Соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венское соглашение).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

Введение

Поиск ингредиентов полученных генетически модифицированных организмов осуществляется путём следующих последовательных (или одновременных) стадий. После отбора образца нуклеиновые кислоты экстрагируются из пробы для анализа. Экстрагированные нуклеиновые кислоты могут далее очищаться в процессе экстракции или после него. Затем производится их количественное определение (при необходимости), разбавление (при необходимости) и они подвергаются аналитическим процедурам (таким как PCR). Эти стадии подробно изложены в настоящем и в следующих международных стандартах:

ISO 21569, *Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на качественном определении нуклеиновых кислот*

ISO 21570, *Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот*

Дополнительная информация об определениях и общих требованиях, упоминающихся в стадиях, цитированных выше, собрана в:

ISO 24276, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения.*

Международная организация по стандартизации (ISO) обращает внимание на заявление о том, что соблюдение настоящего документа может включать использование патента, касающегося технологии PCR.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570:2005>

ISO не высказывает никакого мнения относительно очевидности, достоверности и области применения этих патентных прав.

ISO было проинформировано, что Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. и Hoffman-La Roche являются держателями патентных прав, касающихся технологии PCR. Компании гарантировали ISO, что они намерены вести переговоры о лицензиях на приемлемых и не дискриминационных условиях с заявителями по всему миру. В этой связи заявления держателей этих патентных прав зарегистрированы ISO. Информация может быть получена от:

Licensing Department
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404,
USA

и

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501,
USA

Обращается внимание на возможность того, что некоторые элементы настоящего документа могут быть предметом патентных прав иных, чем определенные выше. ISO не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот

1 Область применения

Настоящий международный стандарт предоставляет общий набор количественных методов обнаружения генетически модифицированных организмов [genetically modified organisms (GMOs)] в продуктах питания с использованием полимеразной цепной реакции [polymerase chain reaction (PCR)].

Он определяет общие требования к специфической амплификации целевых последовательностей DNA с целью количественной оценки содержания DNA (ДНК) из GMO и к подтверждению идентичности амплифицированной последовательности DNA.

Руководящие принципы, минимальные требования и критерии исполнения, изложенные в настоящем международном стандарте, имеют своей целью обеспечение сравнимости, точности и воспроизводимости результатов, получаемых в разных лабораториях.

Настоящий международный стандарт установлен для продуктов питания, но может быть применен также и для других объектов, например, для кормов и растительных образцов, отобранных из окружающей среды.

Специфические примеры методов приведены в Приложениях A–D.

2 Нормативные ссылки

Следующие нормативные документы являются обязательными для применения настоящего документа. Для жестких ссылок применяются только указанное по тексту издание. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 21569:2005, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на качественном определении нуклеиновых кислот*

ISO 21571, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот*

ISO 24276:—¹⁾, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения*

ISO Guide 32, *Калибровка в аналитической химии и использование аттестованных стандартных образцов*

3 Термины и определения

Для целей настоящего документа применяются термины и определения, данные в ISO 24276.

¹⁾ Будет опубликован.

4 Принцип

4.1 Общие положения

Количественный анализ состоит в количественном определении целевой последовательности DNA в образцах для испытания. Каждый метод определяет целевую последовательность(и).

Количественное определение может проводиться с использованием конкурентной PCR ^{[1],[2]} или PCR в реальном времени ^{[3],[4]}.

Количественный анализ должен явно выражать количество целевого генетического элемента относительно количества специфического стандарта, соответствующих материалов, применяющихся для калибровки, и контролей и быть внутри динамического диапазона применяемого аналитического метода и анализируемой пробы для анализа.

Анализ обычно состоит из

- амплификации одной или большего числа специфических целевых последовательностей;
- обнаружения и подтверждения специфичности продукта(ов) PCR, и
- количественного определения амплифицированных фрагментов относительно материалов, применяющихся для калибровки.

ПРИМЕЧАНИЕ В случае анализа с помощью PCR в реальном времени амплификация, обнаружение и подтверждение происходят одновременно.

4.2 Амплификация, обнаружение и подтверждение продуктов PCR

См. описание принципов амплификации, обнаружения и подтверждения последовательностей DNA в ISO 21569.

4.3 Количественное определение продуктов PCR

Принцип количественного определения обычно состоит в определении соотношения (выраженного в процентах) двух целевых последовательностей DNA, т.е. последовательности, представляющей интересующий генетически модифицированный организм, и (эндогенной) последовательности, специфической для целевого таксона. Однако в некоторых случаях количественное определение может также производиться по отношению к определенному количеству основного анализируемого вещества пищевого продукта (например, когда производится обнаружение ГМ-микроорганизмов в пищевых продуктах).

Материалы, применяющиеся для калибровки, которые используются для количественного определения, должны быть пригодными для контроля с сертифицированными стандартными материалами [certified reference materials (CRMs)], если таковые имеются. Если такие материалы отсутствуют, следует использовать другие подходящие стандартные материалы. Примерное руководство приведено в ссылке [5]. Информация об исследованиях по авлидации и погрешности измерения собрана в международных исследованиях ^{[6],[7],[8],[9]}.

5 Реактивы

Все реактивы и материалы, используемые для анализа, должны быть идентичны или эквивалентны реактивам и материалам, определенным в методе. В противном случае все реактивы и материалы должны иметь квалификацию для молекулярно-биологических работ. Эти реактивы должны храниться и использоваться, как рекомендовано поставщиком или в соответствии с техническими требованиями обеспечения качества лабораторных работ. Список реактивов приведен в специальном приложении.

6 Аппаратура и оборудование

См. Приложения с А по D и ISO 24276.

7 Руководящие указания, касающиеся процедуры

7.1 Общие положения

Общие соображения, имеющие отношение к PCR-амплификации для обнаружения ГМО, описаны в ISO 21569.

Приложения с А по D описывают методы PCR-детектирования наряду с деталями их области применения. Для каждого метода подробно описаны демонстрируемые рабочие характеристики.

Концентрация интересующей последовательности DNA должна находиться внутри динамического диапазона метода.

ПРИМЕЧАНИЕ Для определения того, достаточного ли качества кодирующая нить DNA (по длине и структурной целостности), а также достаточны ли ее чистота и количество для обеспечения обнаружения и количественного определения ГМО, принадлежащего к целевому таксону, может быть проведен контрольный прогон, специфический для целевого таксона. Он может быть тем более обоснован, когда DNA экстрагирована из композитного или подвергнувшегося глубокой обработке материала.

DNA, экстрагированная из каждой пробы для анализа, должна быть проанализирована по крайней мере в двух повторностях.

Соответствующие контроли должны быть использованы (см. ISO 24276, Таблица 1).

7.2 Стабильность целевой последовательности

Следует принимать во внимание аллельную и по числу копий стабильность целевой последовательности для сортов различного географического и филогенетического происхождения.

7.3 Калибровка анализа

Должны быть применены соответствующее число калибровочных точек и реплик, охватывающих диапазон количественного определения [например, четыре калибровочных точки в двух репликах (всего 4×2 значений) или шесть калибровочных точек с одним измерением в каждой точке (всего 6 значений)]. Качество калибровки влияет на погрешность измерения^[9].

В качестве альтернативы геномной DNA в качестве стандартного материала для калибровки может использоваться, например, серия разбавлений плазмиды или синтетической двухцепочечной DNA, содержащих целевую последовательность, при условии, что она демонстрирует при калибровке поведение, аналогичное стандартному материалу геномной DNA и геномной DNA, экстрагированной из образца.

7.4 Соображения относительно количественного определения

Методы PCR следует соответствующим образом разрабатывать с целью минимизации изменчивости.

ПРИМЕЧАНИЕ В зависимости от применяемого метода и/или анализируемого материала присутствие конструкций, включающих несколько целевых генов, может привести к завышенной оценке истинного содержания ГМО.

Для определения предела количественного определения (LOQ) см. ISO 24276.

На расчет содержания ГМО, основанный на числе копий целевых последовательностей в гаплоидном геноме, влияет гомо- и гетерозиготность изучаемых образцов. Подробности см. в Приложениях с А по D.

Применение метода $\Delta\Delta C_t$ (порогового цикла) обосновано только в том случае, если эффективности амплификации пробы, специфической для целевого таксона, и пробы, специфической для ГМО, очень близки.

7.5 Требования к обеспечению качества

Для получения достоверных оценок количества целевой последовательности желательна согласованность между измерениями. Однако для установления согласованности измерений необходимо знание относительного стандартного отклонения повторяемости метода (подробности см. в ISO серии 5725). Для расчета относительного стандартного отклонения повторяемости число отдельных измерений на лабораторный образец может превышать то, что допустимо на практике в приемлемых ценах. Следовательно, если наличие указанной происходящей из GMO DNA (в процентах) запроотоколировано, возможное решение требует как минимум:

- a) согласованности внутри пробы для анализа:
 - через отбраковку измерений, меньших предела количественного определения (LOQ), и
 - через максимальное отклонение, наблюдаемое между разбавлениями и индивидуальными измерениями, равное ожидаемому значению, исходя из соответствующего фактора разбавления, $\pm 33\%$;
- b) согласованности между пробами для анализа:
 - расчетные относительные концентрации происходящей из GMO DNA, полученные с учетом пункта а) для каждой пробы для анализа, не должны различаться на значение, превышающее от -50% до $+100\%$ оцененного значения количества (равного $\Delta C_t 1$ при PCR в реальном времени) (т.е. для двух проб для анализа приемлемы результаты измерений $1,0\%$ и $2,0\%$, в то время как $0,9\%$ и $2,1\%$ — неприемлемы).

Для того чтобы гарантировать точность измерений, для количества исследуемого события должен выбираться и анализироваться стандартный материал [reference material (RM)], предпочтительно сертифицированный (CRM), с соответствующим уровнем метрологической надежности и с надлежащим сходством вещества продукта. В отсутствие CRM может быть приготовлен RM собственного производства с помощью процедуры, обеспечивающей стабильность, однородность и единство измерений и гарантирующей отсутствие систематического отклонения. Оцененная количественно погрешность должна удовлетворять требуемой для калибровки (см. ISO Guide 32).

8 Интерпретация

Результаты PCR могут быть либо

- a) пригодными для количественной оценки целевой последовательности при условии, что
 - результат положительный в соответствии с 8.1 ISO 21569:2005,
 - наблюдаемое ингибирование реакции незначительно,
 - аналитические процедуры дают однозначное значение измерений,
 - количество целевой последовательности находится внутри динамического диапазона метода, и
 - проведена калибровка аналитической процедуры соответствующим образом (см. 7.3), или
- b) непригодными для количественной оценки целевой последовательности, если любое из перечисленных выше условий не было соблюдено.

Погрешность измерения должна быть достаточно мала для того, чтобы лаборатория могла дать обоснованное заключение.

В Приложениях с A по D описаны измерения количеств целевой DNA. Эти количества могут быть использованы для расчета количества GMO. Эти расчеты обычно принимают во внимание такие относящиеся к делу биологические факторы, как гомо- и гетерозиготность целевых последовательностей.

Если количество целевой GM-последовательности или последовательности, специфической для целевого таксона, ниже предела количественного определения, результат должен выражаться только качественно.

ПРИМЕЧАНИЕ Утверждение, что количество происходящей из GMO DNA ниже фактического предела количественного определения, сопровождающееся его спецификацией, рассматривается как качественное выражение результата.

9 Выражение результатов

Результаты должны ясно констатировать количество целевой GM-последовательности относительно последовательности, специфической для целевого таксона. Результаты должны также содержать значения погрешности измерения, такие как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение. Кроме того, должны приводиться значения предела детектирования и предела количественного определения метода и фактические пределы детектирования и количественного определения.

Целевые последовательности могут быть, а могут и не быть обнаружены, или количество по крайней мере одной из них может быть ниже предела количественного определения. В Таблице 1 описаны четыре альтернативных случая и соответствующее им выражение результата, которые должны быть включены в протокол испытания.

Таблица 1 — Выражение результатов

Результат	Выражение результатов
Последовательность, специфическая для целевого таксона, не обнаружена.	См. ISO 21569. “Для вида x DNA не обнаружена.”
Последовательность, специфическая для целевого таксона, обнаружена, но не обнаружена целевая последовательность, происходящая из GMO.	В соответствии с ISO 21569. “Для вида x DNA, происходящая из GMO, не обнаружена.” В надлежащих случаях, кроме того, добавляется “Фактический предел детектирования составляет X %” (Указываются использованные единицы).
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая последовательность, происходящая из GMO, однако количество, по крайней мере, одной из целевых последовательностей ниже предела количественного определения.	Для каждого GMO констатируется: “DNA, происходящая из GMO (специфицируется GMO), обнаруженная с помощью (специфицируется целевая последовательность), полученной из (специфицируется вид), была обнаружена.” В надлежащих случаях, кроме того, добавляется “Фактический предел количественного определения составляет X %” (Указываются использованные единицы).
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая последовательность, происходящая из GMO, и количество обеих целевых последовательностей выше предела количественного определения.	Для каждого GMO констатируется: “Содержание DNA, происходящей из GMO (специфицируется GMO), обнаруженное с помощью (специфицируется целевая последовательность), полученной из (специфицируется вид), составляет X ± погрешность %.” (Указываются использованные единицы).

Может также указываться содержание DNA, происходящей из GMO, с учетом погрешности измерения как в том случае, когда оно превышает конкретное значение, так и когда не достигает ее.

10 Протокол испытания

Протокол испытания должен быть написан в соответствии с ISO 24276 и ISO 21569 и должен содержать по крайней мере следующую дополнительную информацию:

- предел количественного определения (LOQ) метода и материал, с помощью которого он был установлен;
- фактический предел количественного определения (LOQ);
- ссылка на метод, который был использован для экстракции DNA;
- использованный стандартный материал;
- результаты, выраженные в соответствии с Разделом 9.

Приложение А (информативное)

Методы, специфические для целевого таксона

А.1 Метод, специфический для целевого таксона, для определения абсолютного количественного содержания DNA гена *adh1* из кукурузы с использованием метода PCR в реальном времени

А.1.1 Введение

В этом приложении описан метод специфической амплификации и количественного определения таксон-специфического (вспомогательного) гена *adh1* (кодирующего алкогольдегидрогеназу 1) из кукурузы (*Zea mays*) для определения содержания DNA кукурузы или для тестирования присутствия/отсутствия в растворах DNA, экстрагированной из продуктов, содержащих кукурузную DNA, например, из пищевых продуктов, детектируемых количеств ингибиторов PCR.

Ограничения см. в А.1.8.

А.1.2 Статус валидации и характеристики рабочих параметров

А.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для DNA, экстрагированной из чистых размолотых кукурузных зерен, листьев кукурузы и сертифицированных стандартных материалов (серий IRMM-411, IRMM-412, IRMM-413^[10]^[11]).

Воспроизводимость описанного метода была проверена с помощью совместных испытаний с использованием неизвестных образцов (от U1 до U6), состоящих из DNA кукурузы дикого типа с различным числом копий соответствующей целевой последовательности (см. А.1.2.2), а также других совместных испытаний в комбинации с методами, специфическими для трансформационных событий GM-кукурузы, например, Bt11 (см. D.1).

Число копий целевой последовательности на гаплоидный геном должно быть равно 1^[11].

Должна быть установлена аллельная стабильность целевой последовательности^[11].

А.1.2.2 Совместные испытания

Валидация метода была проведена в ходе совместных испытаний, организованных Объединенным исследовательским центром Еврокомиссии (EC-JRC) и Институтом защиты здоровья и потребителей [Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)] в соответствии с Международным гармонизированным протоколом^[12].

Для построения калибровочной кривой для определения абсолютного количества гаплоидных геномов кукурузы в неизвестных образцах были использованы шесть образцов (S1-S6) DNA кукурузы дикого типа (экстрагированной из материала листьев^[13], содержащей известное абсолютное число копий (183 486, 61 162, 20 387, 6 796, 2 265 и 755) гаплоидных геномов кукурузы. Абсолютное число копий в известных образцах было определено путем деления массы образца DNA (определенной методом флуориметрического количественного определения двухцепочечной DNA фирмы PicoGreen, Molecular Probes, Cat. Number P-7589) на опубликованное среднее значение 1С для геномов кукурузы (2,725 пг)^[14].

Шесть образцов (U1-U6) DNA кукурузы дикого типа (экстрагированной из материала листьев^[13]) были использованы в качестве неизвестных образцов. Ожидаемое число копий в неизвестных образцах было определено тем же методом, что и в известных образцах.

Результаты валидации метода, полученные в ходе совместных испытаний, суммированы в Таблице А.1.

Валидация метода была также проведена в комбинации с методами, специфическими для трансформационных событий для нескольких образцов GM-кукурузы, например, для сладкой кукурузы Bt11. Подробности комбинированных испытаний (относительного количественного определения) см. в ссылках [15] и [16], а также в D.1.

Таблица А.1 — Данные валидации

	Образец					
	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Число участвовавших лабораторий	12	12	12	12	12	12
Число лабораторий, имеющих возвратные результаты	10	10	10	10	10	10
Число лабораторий с недостоверными результатами	1	1	1	1	1	1
Число оставшихся лабораторий	9	9	9	9	9	9
Число образцов на лабораторию	4	4	4	4	4	4
Число выбросов Кохрена	1	1	1	1	—	—
Число выбросов Граббса	—	1	1	1	1	1
Число принятых образцов	35	34	34	34	35	35
Ожидаемое значение числа копий	7 339	18 349	36 697	55 046	91 743	146 788
Среднее значение числа копий	9 985	2 3885	46 918	75 161	100 541	122 080
Отклонение от истинного значения (%)	36,1	30,2	27,9	36,5	9,6	-16,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r^a	1 318,59	1 463,60	5 796,58	4 539,57	11 306,89	14 843,41
Относительное стандартное отклонение повторяемости (%) ^b	13,21	6,13	12,35	6,04	11,25	12,16
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R^a	2 013,12	2 083,57	6 145,39	6 806,85	14 592,04	17 777,70
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости (%) ^b	20,16	8,72	13,10	9,06	14,51	14,56

^a Выражается как значение числа копий.
^b Выражается как процент среднего значения.

А.1.2.3 Молекулярная специфичность

А.1.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой части последовательности, описанной в EMBL/GenBank/DDBJ²⁾ регистрационный номер X04050. Эта последовательность является уникальной для *Zea mays* (кукуруза/маис) и *Zea mays* subsp. *diploperennis* (теосинте мексиканского)^[11].

А.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов была оценена путем поиска в базах данных EMBL/GenBank/DDBJ²⁾ с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN²⁾ на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> [9 октября 2003]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

²⁾ Это примеры доступных на рынке подходящих продуктов. Приведенная информация дана для удобства пользователей этого международного стандарта и не является подтверждением ISO названного продукта. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если может быть показано, что они приводят к тем же результатам.

A.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Специфичность метода была проверена в отношении широкого диапазона нецелевых таксонов и 20 различных линий кукурузы, представляющих географическое и филогенетическое разнообразие образцов^[11]. Не было обнаружено перекрестной реактивности с нецелевыми таксонами (за исключением теосинте мексиканского *Zea mays* subsp. *diploperennis*, дикого предка культурной кукурузы)^{[11],[17]}. Были установлены число копий и аллельная стабильность целевой последовательности у различных линий кукурузы^[11].

A.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для системы детектирования последовательностей [sequence detection system (SDS)]³⁾ ABI PRISM 7700® и TaqMan® химия³⁾. Расчет праймеров и зондов был произведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems)³⁾.

A.1.2.5 Предел детектирования (LOD)

В соответствии с рекомендациями разработчика метода, абсолютный LOD составляет 10 копий целевой последовательности^[11].

Наименьшее число копий целевой последовательности, включенных в совместные испытания, составляло 7 399 копий целевой последовательности.

A.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

В соответствии с рекомендациями разработчика метода, абсолютный LOQ составляет 100 копий целевой последовательности^[11].

Наименьшее число копий целевой последовательности, включенных в совместные испытания, составляло 7 399 копий целевой последовательности.

A.1.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

A.1.4 Принцип

Фрагмент гена *adh1* в 134 п.о. амплифицируют с использованием двух кукурузных *adh1*-специфических праймеров (см. Таблицу A.2). Накопление продуктов PCR измеряют в конце каждого цикла PCR (в реальном времени) с помощью кукурузного *adh1*-специфического олигонуклеотидного зонда (ADH1-MDO, см. Таблицу A.2), меченого двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применяют TaqMan® химию³⁾.

Измеренный сигнал флуоресценции пересекает определяемое пользователем пороговое значение после нескольких циклов. Число этих циклов называют C_T -значением. Для количественной оценки количества кукурузной *adh1*-DNA в неизвестном образце C_T -значение преобразуют в соответствующее значение числа копий путем сравнения с калибровочной кривой, чьи C_T -значения напрямую связаны с известным числом копий (регрессионный анализ).

A.1.5 Реактивы

A.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве используемых реактивов см. ISO 24276:–, 6.6.

³⁾ Это примеры доступных на рынке подходящих продуктов. Приведенная информация дана для удобства пользователей этого международного стандарта и не является подтверждением ISO названного продукта. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если может быть показано, что они приводят к тем же результатам.

A.1.5.2 Вода**A.1.5.3 Буфер для PCR (без MgCl₂), 10-кратный.****A.1.5.4 Раствор MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 ммоль/л.****A.1.5.5 Раствор дНТФ, c(дНТФ) = 2,5 ммоль/л (каждый).****A.1.5.6 Олигонуклеотиды**

Подробности относительно применяемых олигонуклеотидов приведены в Таблице А.2.

Таблица А.2 — Олигонуклеотиды

Наименование	DNA- последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при PCR
ADH-FF3	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'	300 нмоль/л
ADH-RR4	5'-CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'	300 нмоль/л
ADH1-MDO	5'-FAM-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCA-TAMRA-3' ^a	200 нмоль/л

^a FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилпродамин.

Длина ампликона *adh1* составляет 134 п.о.

A.1.5.7 Термостабильная DNA-полимераза

DNA-полимераза⁴⁾ AmpliTaq Gold[®].

A.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (необязательно).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

A.1.5.9 Реакционная смесь для амплификации

Подробно о реакционной смеси для амплификации см. в Таблице А.3.

Таблица А.3 — Реакционная смесь для амплификации в окончательном объеме/концентрации на реакцию пробирку

Суммарный реакционный объем	25 мкл	
Кодирующая нить DNA (максимум 250 нг)	5 мкл	
Тaq-DNA-полимераза	TaqMan [®] Universal Master Mix 2X	12,5 мкл (1 X)
Деконтаминационная система (дУТФ, включая урацил-N-гликозилазу)		
Реакционный буфер (содержащий пассивный стандартный ROX) ^a		
смесь дНТФ		
Праймеры	см. Таблицу А.2	см. А.1.5.6
Зонд	см. Таблицу А.2	см. А.1.5.6

^a ROX = карбокси-X-родамин.

⁴⁾ Это примеры доступных на рынке подходящих продуктов. Приведенная информация дана для удобства пользователей этого международного стандарта и не является подтверждением ISO названного продукта. Могут быть использованы эквивалентные продукты, если может быть показано, что они приводят к тем же результатам.