
**Produits alimentaires — Méthodes
d'analyse pour la détection des
organismes génétiquement modifiés et
des produits dérivés — Extraction des
acides nucléiques**

*Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*
(standards.iteh.ai)

ISO 21571:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21571:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005>

© ISO 2005

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives.....	1
3 Principe	1
3.1 Généralités.....	1
3.2 Extraction de l'ADN.....	2
3.3 Quantification de l'ADN	2
4 Exigences générales applicables aux laboratoires	2
5 Mode opératoire	2
5.1 Préparation de la prise d'essai	2
5.2 Extraction/purification de l'ADN	4
5.3 Quantification de l'ADN extrait	5
5.4 Stabilité de l'ADN extrait	6
6 Interprétation	6
7 Rapport d'essai	6
Annexe A (informative) Méthodes pour l'extraction de l'ADN.....	8
Annexe B (informative) Méthodes de quantification de l'ADN extrait.....	36
Bibliographie	43

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'ISO 21571 a été élaborée par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21571:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005>

Introduction

La recherche d'ingrédients génétiquement modifiés comprend les étapes successives (ou simultanées) suivantes. Après la collecte de l'échantillon, les acides nucléiques sont extraits de la prise d'essai. Les acides nucléiques extraits peuvent faire l'objet d'une purification plus poussée lors du processus d'extraction ou ultérieurement. Ensuite, ils sont quantifiés (si besoin est), dilués (si besoin est) et soumis à des modes opératoires analytiques (comme la PCR). Ces étapes sont décrites en détail dans le présent document et dans les Normes internationales suivantes:

ISO 21568, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Échantillonnage*

ISO 21569, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*

ISO 21570, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*

D'autres informations concernant les définitions et aspects généraux évoqués dans les étapes citées ci-avant sont réunies dans le document suivant:

ISO 24276, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés fondées sur l'utilisation des acides nucléiques — Exigences générales et définitions*

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) attire l'attention sur le fait que la mise en conformité avec la présente Norme peut nécessiter l'utilisation d'un droit de propriété intellectuelle concernant la méthode d'extraction fondée sur l'utilisation de la silice (N° EP 0389063/USP 5,234,809), donnée dans l'Article 4.

L'ISO ne saurait être tenue responsable concernant la preuve, la validité et le champ d'application dudit droit de propriété.

Le propriétaire des droits de propriété industrielle a exprimé auprès de l'ISO sa volonté de négocier des licences selon des termes et des conditions raisonnables et non discriminants avec les requérants dans le monde. En ce qui concerne ces questions, la déclaration du propriétaire desdits droits de propriété industrielle est enregistrée auprès de l'ISO. Pour de plus amples informations, contacter:

Jean Deleforge

BioMérieux

Chemin de l'Orme

69280 Marcy l'Étoile, France

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle autres que les droits identifiés ci-avant. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

iTeh STANDARD PREVIEW **(standards.iteh.ai)**

ISO 21571:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005>

Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale indique les exigences générales et les méthodes spécifiques pour l'extraction, la purification et la quantification de l'ADN. Ces méthodes sont décrites dans les Annexes A et B.

La présente Norme internationale a été élaborée pour les matrices alimentaires, mais peut également s'appliquer à d'autres matrices (par exemple grains et aliments pour animaux).

Elle a été conçue dans le cadre d'une série de méthodes d'analyse fondées sur l'utilisation de l'acide nucléique, notamment l'ISO 21569 (méthodes d'analyse qualitative) et l'ISO 21570 (méthodes d'analyse quantitative).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

2 Références normatives

Les documents référencés ci-après sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication (y compris ses amendements) à laquelle il est fait référence s'applique.

ISO 24276:—¹⁾, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés fondées sur l'utilisation des acides nucléiques — Exigences générales et définitions*

ISO 21568, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Échantillonnage*

3 Principe

3.1 Généralités

L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques est de disposer d'acides nucléiques appropriés pour les analyses ultérieures (voir l'ISO 24276).

NOTE 1 La «qualité» de l'ADN est liée à la longueur moyenne des molécules d'ADN extraites, de la pureté chimique et de l'intégrité structurale de la séquence d'ADN et de la double hélice, par exemple de la présence de liaisons intra et interbrin entre les bases, de brèches dans les fragments simple brin, des liaisons croisées avec des polyols, de l'hémine, etc. En outre, de telles altérations sont souvent spécifiques à la séquence et ne sont donc pas distribuées de façon aléatoire le long du génome (voir Références [1], [2], [3], [4]).

L'attention des utilisateurs de la présente Norme internationale est attirée sur le fait que certaines méthodes, telles que les méthodes utilisant la silice, sont susceptibles d'être protégées par des droits de propriété intellectuelle.

1) À publier.

3.2 Extraction de l'ADN

Le principe de base de l'extraction de l'ADN consiste à libérer l'ADN présent dans la matrice et, parallèlement ou par la suite, à éliminer les inhibiteurs de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADN.

Des méthodes d'extraction et de purification de l'ADN sont décrites à l'Annexe A. C'est pourquoi l'utilisateur choisit la méthode la plus appropriée en fonction de la matrice à étudier d'après son expérience, en prenant en compte le domaine d'application et les exemples de matrices donnés dans chaque méthode.

D'autres protocoles sont applicables à condition que la méthode ait été validée pour la matrice spécifiquement soumise à essai.

3.3 Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN extrait pourrait être utilisée par la suite pour les analyses par PCR.

Elle peut être effectuée à l'aide de méthodes physiques (par exemple mesure d'absorbance à une longueur d'onde spécifique), physico-chimiques (par exemple utilisation d'agents intercalants ou liants permettant une émission de fluorescence), enzymatique (par exemple détection par bioluminescence) ou par PCR quantitative. La dernière méthode est particulièrement bien adaptée aux matrices composites ou aux échantillons à faible teneur en ADN ou dont l'ADN est dégradé.

Il existe plusieurs méthodes permettant de quantifier l'ADN présent dans une solution, qui sont décrites à l'Annexe B. Le choix de la méthode la plus appropriée incombe à l'utilisateur, qui doit tenir compte de la quantité et de la qualité d'ADN à analyser et par conséquent, de la matrice de laquelle l'ADN a été extrait.

D'autres protocoles sont applicables à condition que la méthode ait été validée pour la matrice spécifiquement soumise à essai.

4 Exigences générales applicables aux laboratoires

Une contamination accidentelle par de l'ADN peut provenir de poussières ou d'aérosols. En conséquence, l'organisation de l'espace de travail au sein des laboratoires est logiquement fondée sur

- le confinement systématique des étapes méthodologiques intervenant dans l'obtention des résultats, et
- le principe de la marche en avant concernant la manipulation des échantillons.

Le second principe garantit que l'ADN à analyser et l'ADN amplifié produit par PCR sont soumis à une ségrégation physique.

Des informations plus détaillées figurent dans l'ISO 24276.

5 Mode opératoire

5.1 Préparation de la prise d'essai

5.1.1 Généralités

Les variables spécifiques au produit (par exemple l'humidité) et le traitement peuvent avoir une incidence sur la quantité et la qualité de l'ADN extrait du matériau étudié. Par conséquent, les caractéristiques de performance d'une méthode d'extraction donnée dépendent de la matrice étudiée.

Prendre les mesures appropriées afin que la prise d'essai soit représentative de l'échantillon de laboratoire.

La prise d'essai doit être de taille suffisante et contenir un nombre suffisant de particules pour être représentative de l'échantillon de laboratoire, par exemple 3000 particules pour une limite de détection de 0,1 %, afin de permettre une analyse statistiquement valable (voir l'ISO 21568).

Pour des raisons pratiques/techniques, il est recommandé de ne pas utiliser de prise d'essai de masse supérieure à 2 g.

Toute restriction liée à la représentativité suivant la taille de la prise d'essai doit être consignée et prise en compte dans l'interprétation des résultats d'analyse. Les méthodes d'extraction de l'ADN présentées dans l'Annexe A décrivent des prises d'essai comprises entre 200 mg et 500 mg, qui conviennent généralement pour des matériaux riches en ADN (par exemple des grains moulus, de la farine). Néanmoins, dans certaines matrices contenant des quantités d'ADN faibles ou de l'ADN dégradé, la quantité d'ADN extraite peut ne pas être suffisante pour des analyses. Dans ce cas, la prise d'essai peut être augmentée.

Les extractions d'ADN doivent être effectuées sur au moins deux prises d'essai.

Le stockage des étalons, des échantillons et des prises d'essai doit satisfaire aux exigences de l'ISO 24276 et être organisé de manière à préserver les paramètres biochimiques à analyser (voir l'ISO/CEI 17025 pour les détails).

5.1.2 Échantillons

Toutes les opérations de préparation des échantillons (par exemple broyage, homogénéisation, division, séchage) doivent être effectuées conformément aux procédures décrites dans l'ISO 24276 en prenant soin d'éviter toute contamination de l'échantillon ou toute modification de sa composition.

Les échantillons de laboratoire doivent être suffisamment homogènes avant de les réduire et de prélever la prise d'essai.

Pour les échantillons liquides, secouer le récipient contenant l'échantillon pour améliorer l'homogénéisation du produit. Dans le cas de produits non homogènes, tels que les huiles brutes, vérifier que les sédiments ont été complètement éliminés des parois du récipient.

Pour les matrices solides qui ne peuvent pas être mises en suspension facilement, la matrice doit être broyée afin de réduire la taille des particules et/ou faciliter l'extraction de l'ADN. Dans ce cas, une attention particulière doit être accordée à la taille des particules. La prise d'essai soumise à l'extraction doit contenir un nombre minimal de particules, conformément à l'ISO 21568. Il convient que les dispositifs de mouture/broyage puissent être complètement nettoyés; ces dispositifs doivent être sélectionnés de façon à atteindre le nombre de particules et la distribution de tailles de particules souhaités dans la prise d'essai, conformément à l'ISO 21568.

Si des composants de l'échantillon de laboratoire ont été éliminés avant l'extraction, consigner cette procédure.

Concernant les produits finis sous forme solide ou pâteuse ayant une teneur en lipides élevée, il n'est généralement pas facile d'obtenir la taille de particules souhaitée en effectuant une seule étape de broyage. Plusieurs modes opératoires peuvent donc être ajoutés, comme l'extraction des lipides à l'aide d'hexane après broyage et congélation ou après lyophilisation avant broyage.

Pour faciliter le broyage des produits pâteux ou visqueux, il est possible d'appliquer à certaines matrices l'un des traitements suivants:

- chauffage jusqu'à la température maximale de 40 °C;
- dissolution dans un liquide approprié, par exemple l'eau;
- congélation à une température inférieure ou égale à -20 °C.

Homogénéiser l'ensemble de l'échantillon de laboratoire. Prélever les deux prises d'essai en tenant compte des dilutions ou concentrations éventuelles.

Il convient de prendre des précautions afin que le mode opératoire de mouture/broyage réduise le plus possible le chauffage de l'échantillon, car le chauffage peut avoir un effet négatif sur la qualité de l'ADN extrait.

Les techniques de mouture/broyage présentant un important risque de contamination croisée (comme celles utilisant conjointement de l'azote liquide et un mortier) doivent être évitées autant que possible. Suivant les bonnes pratiques, il convient d'isoler des autres étapes analytiques toute étape produisant de la poussière.

Si des sels, des épices et des sucres en poudre et/ou d'autres substances susceptibles d'avoir une incidence sur l'extraction ou l'analyse sont présents, il convient de considérer des étapes de purification appropriées conformément à la méthode sélectionnée (voir Annexe A).

Par exemple, dans les échantillons provenant de matrices composites, la matrice cible (par exemple la couche de panure des bâtonnets de poisson) peut être isolée pour permettre l'extraction de l'ADN.

5.2 Extraction/purification de l'ADN

5.2.1 Généralités

Les considérations ci-après s'appliquent pour la conception des méthodes d'extraction.

Il convient que la qualité de l'acide extrait et le rendement d'extraction suivant une méthode donnée sur une matrice donnée soient à la fois répétables et reproductibles en termes d'analyse, lorsque la quantité d'acide nucléique présent dans la matrice dont il a été extrait est suffisante.

Pour obtenir de l'ADN de bonne qualité, il est conseillé d'éliminer, lorsque cela est approprié:

- les polysaccharides (pectine, cellulose, hémi-cellulose, amidon, agents épaississants, etc.) au moyen de traitements enzymatiques appropriés (par exemple pectinase, cellulase, hémi-cellulase, α -amylase) ou par extraction organique (par exemple bromure d'hexadecyltriméthylammonium/chloroforme);
- l'ARN et/ou les protéines par un traitement approprié, par exemple un traitement enzymatique par RNase dans le premier cas et un traitement par protéinase dans le second cas;
- les fractions lipidiques, par traitement enzymatique ou à l'aide de solvants (comme le *n*-hexane);
- les sels (par exemple à partir du tampon d'extraction/de lyse, à partir de l'étape de précipitation) susceptibles de perturber les analyses ultérieures.

Dans le cas d'échantillons solides ou secs, en particulier, il convient que le volume de tampon d'extraction/de lyse soit adapté pour garantir la mise en solution de l'ADN.

NOTE 1 La purification de l'ADN peut être effectuée par différentes méthodes comme la précipitation fractionnée, l'utilisation de solvants tels que le phénol, le chloroforme, l'éthanol, l'isopropanol et/ou par adsorption sur des matrices solides (résine échangeuse d'ions, gel de silice ou de verre, terre de diatomées, membranes, etc.). Plusieurs méthodes de purification de l'ADN peuvent être combinées. Le cas échéant, l'extraction et la purification peuvent être effectuées en une seule étape.

Si un produit co-précipitant de l'ADN, tel que le glycogène, le PEG ou l'ARNt est utilisé pour augmenter la récupération d'ADN lors des étapes de précipitation, il ne doit présenter ni activité nucléasique, ni inhibiteurs/compétiteurs de la PCR, ni homologie de séquence avec la cible potentielle de la PCR à l'étude. Pour les plantes génétiquement modifiées, le porteur d'ADN peut être, par exemple, de l'ADN de sperme de saumon ou de hareng.

Lorsque des appareils de lyophilisation sous vide sont utilisés pour sécher les pelotes d'ADN après précipitation, il convient de prendre en compte le risque de contamination croisée.

Remettre l'ADN en solution dans l'eau ou dans une solution tampon qui évite la dégradation de l'ADN.

Lorsqu'une nouvelle méthode d'extraction de l'ADN est mise en œuvre ou lorsque l'une des méthodes décrites à l'Annexe A est appliquée à une nouvelle matrice, il convient que la qualité et l'intégrité potentielles de l'ADN extrait à l'aide du protocole choisi soient évaluées de la manière suivante: une quantité connue de traceur ADN est ajoutée au tampon de lyse en plus de l'échantillon utilisé pour l'extraction de l'ADN. Lorsque le traceur choisi est une quantité prédéterminée d'ADN ou représente un nombre prédéterminé de copies d'une séquence ADN donnée, mélangés à une matrice au début de l'extraction de l'ADN, une attention particulière doit être accordée pour établir l'absence d'homologie entre la séquence du traceur et la séquence de l'ADN à l'étude.

NOTE 2 L'utilisation d'un traceur ADN permet une bonne approximation de la situation réelle lorsque l'ADN d'une matrice donnée est supposé être associé à d'autres composants (par exemple des protéines). Une telle méthode pourrait également être utilisée pour estimer la présence d'inhibiteurs de PCR solubles et en position *trans* dans l'ADN extrait (voir l'ISO 24276, l'ISO 21569 et l'ISO 21570).

Le traceur ADN peut donner une fausse impression de récupération; toutefois, le traceur ADN peut être plus facile à séparer de la matrice que l'ADN cible.

5.2.2 Contrôles

Les contrôles à inclure sont décrits dans le Tableau 1 de l'ISO 24276:—. Il convient que ces contrôles incluent au moins un contrôle d'extraction à blanc, un contrôle d'extraction positif mais également un contrôle de l'environnement.

5.2.3 Contrôle de pureté de l'ADN: contrôle interne par PCR

Lorsqu'une nouvelle méthode d'extraction de l'ADN est mise en œuvre, la présence d'inhibiteurs de PCR dans l'ADN extrait peut être estimée à l'aide d'ajouts d'ADN (voir l'ISO 24276, l'ISO 21569 et l'ISO 21570). La quantité d'ADN ajouté ne doit pas dépasser le niveau maximal supporté par la PCR et contenir un nombre déterminé de copies de séquences cibles. Il convient que ce nombre soit déterminé individuellement pour chaque séquence cible et indiqué sous la forme d'un multiple de la limite de détection inférieure existante. Idéalement, il convient que la concentration cible du contrôle PCR positif corresponde à la sensibilité nécessaire pour l'analyse. Des précautions particulières doivent être prises lors de l'utilisation d'ADN cible cloné très concentré. Dans la mesure du possible, les contrôles positifs doivent être conformes aux conditions des produits soumis à essai en ce qui concerne les acides nucléiques qu'ils contiennent.

5.3 Quantification de l'ADN extrait

5.3.1 Généralités

La qualité, l'intégrité et le volume de la matrice ont une incidence sur la performance de la méthode analytique et donc les résultats obtenus. Par conséquent, la limite de détection d'une méthode spécifique peut dépendre de la quantité d'acides nucléiques utilisée.

La quantification de l'ADN permet de:

- comparer le rendement de différents protocoles d'extraction de l'ADN pour une matrice donnée (répétabilité), et de
- mesurer la concentration en acides nucléiques avant l'analyse.

5.3.2 Domaine de mesure

Chaque méthode de quantification doit être appliquée dans la gamme dynamique applicable en tenant également compte de son niveau de fidélité.

5.3.3 Étalons de quantité

L'exactitude des méthodes de quantification dépend des étalons d'acide nucléique utilisés pour étalonner la méthode.

Si la méthode utilisée est sensible à la taille et/ou à la qualité des fragments d'acide nucléique, alors il faut utiliser les étalons d'acide nucléique correspondant à la taille et/ou à la qualité de l'acide nucléique attendu.

Il convient que le matériau de référence utilisé garantisse la traçabilité aux références spécifiées, généralement des étalons nationaux ou internationaux, par le biais d'une chaîne de comparaison ininterrompue (voir le Guide ISO 30).

Si la méthode utilisée fait intervenir des agents intercalants, il convient d'utiliser un étalon d'ADN de masse moléculaire élevée pour quantifier un ADN de masse moléculaire élevée. Il convient d'utiliser un étalon d'ADN de masse moléculaire faible pour quantifier de l'ADN de masse moléculaire faible. À noter que l'ADN extrait, même s'il est décrit comme ayant une masse moléculaire élevée, contient généralement une certaine quantité de fragments de masse moléculaire faible. Cela signifie que de nombreuses méthodes employées pour la quantification d'ADN manquent souvent d'exactitude, ce facteur devant être pris en compte.

NOTE En outre, suivant la matrice et le type de méthode d'extraction, une certaine proportion de l'ADN extrait peut être récupérée sous forme d'ADN simple brin (avec une capacité d'intercalation bien plus faible), ce qui entraîne une sous-estimation de la teneur globale en ADN. En revanche, l'ADN simple brin est bien détecté par mesurage physique.

Au moins trois points d'étalonnage (de préférence provenant de réplicats) sont requis pour établir une bonne courbe d'étalonnage. La quantité d'étalon d'ADN utilisée pour chaque point d'étalonnage dépend de la sensibilité de la méthode et de la gamme dynamique considérée.

5.4 Stabilité de l'ADN extrait

L'ADN extrait en vue d'analyses ultérieures doit être stocké dans des conditions garantissant sa stabilité.

Il convient d'éviter de congeler et de décongeler plusieurs fois des solutions d'ADN.

6 Interprétation

La méthode d'extraction de l'ADN doit être adaptée de façon à obtenir la qualité et la quantité d'acide nucléique souhaitée en vue de l'analyse ultérieure.

Il convient d'évaluer la qualité de l'acide nucléique extrait à l'aide d'une méthode d'analyse dont les mêmes paramètres de qualité sont identiques à ceux de l'analyse à réaliser sur l'acide nucléique extrait (par exemple, si l'analyse à effectuer est une PCR, il convient alors qu'une PCR supplémentaire soit utilisée pour l'évaluation de la qualité de l'ADN extrait).

D'autres paramètres de compatibilité figurent dans l'ISO 21569, l'ISO 21570 et l'ISO 24276.

7 Rapport d'essai

Le rapport d'essai final doit être conforme à l'ISO 24276 et contenir les informations complémentaires suivantes afin de documenter l'activité du laboratoire:

- une description de la procédure de dérivation des prises d'essai, ainsi que de tout traitement préliminaire auquel l'échantillon a été soumis avant extraction de l'acide nucléique;
- la taille des prises d'essai utilisées pour l'extraction de l'acide nucléique;
- le(s) protocole(s) d'extraction de l'acide nucléique appliqué(s);

- toute particularité observée durant les essais;
- toute opération non spécifiée dans la méthode ou considérée comme facultative mais pouvant avoir une incidence sur les résultats;
- l'interprétation des résultats;
- le nom de la ou des personne(s) chargée(s) des expériences.

NOTE Le stockage et la manipulation des données brutes sont décrits dans l'ISO/CEI 17025, ainsi que les programmes d'assurance qualité associés. La conformité aux spécifications est recommandée.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 21571:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005>

Annexe A (informative)

Méthodes pour l'extraction de l'ADN

A.1 Préparation d'ADN de qualité PCR à l'aide des méthodes d'extraction utilisant le phénol/chloroforme

A.1.1 Méthode de base d'utilisation du phénol/chloroforme

A.1.1.1 Domaine d'application

Cette méthode de routine (voir Référence [5]) convient pour l'extraction de l'ADN à partir d'une grande variété de matrices (voir A.1.1.8).

Le phénol convient généralement très bien à la destruction des nucléases et à la dénaturation des protéines.

Lorsque des feuilles ou du matériel frais (par exemple des feuilles de chicorée, de la luzerne sèche, etc.) sont à analyser, de nombreux inhibiteurs de PCR peuvent également co-précipiter avec l'ADN. Pour cette raison, il peut être difficile d'obtenir de l'ADN amplifiable par PCR de façon reproductible.

Les propriétés corrosives du phénol doivent être prises en considération. C'est pourquoi les méthodes d'extraction utilisant le bromure d'hexadecyltriméthylammonium et/ou le PVP et/ou l'adsorption sur silice sont de préférence exploitées en priorité.

A.1.1.2 État

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/02043d6d-ed20-45d1-a0e6-2c21c5619f9d/iso-21571-2005>

La méthode est connue depuis quarante ans et a été largement appliquée dans tous les domaines de la biologie, de l'agronomie et de la médecine, mais n'a jamais été évaluée par le biais d'essais interlaboratoires concernant la détection des OGM dans les aliments.

A.1.1.3 Principe

La méthode consiste en une étape de lyse (lyse thermique en présence de dodécyl sulfate de sodium et d'EDTA concentré), suivie de l'élimination des contaminants (comme les molécules lipophiles, les polysaccharides et les protéines) et de nucléases à partir de la phase aqueuse contenant l'ADN à l'aide de phénol et de chloroforme. Une précipitation finale de l'ADN à l'éthanol concentre l'ADN et élimine les sels et le chloroforme résiduel. L'étape critique de la méthode est l'étape de lyse [5].

A.1.1.4 Mesures générales et de sécurité

Une hotte aspirante est nécessaire pour la manipulation des produits chimiques organiques.

A.1.1.5 Réactifs

A.1.1.5.1 Éthanol, fraction volumique ϕ (C_2H_5OH) = 96 %.

Stocker et utiliser à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.1.1.5.2 Acide acétique glacial (CH_3COOH).

A.1.1.5.3 Acétate de potassium ($C_2H_3O_2K$).

- A.1.1.5.4 Acide chlorhydrique**, ϕ (HCl) = 37 %.
- A.1.1.5.5 Alcool isoamylique** [(CH₃)₂CHCH₂CH₂OH].
- A.1.1.5.6 Phénol** (C₆H₅OH).
- A.1.1.5.7 Chloroforme** (CHCl₃).
- A.1.1.5.8 Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane** (Tris) (C₄H₁₁NO₃).
- A.1.1.5.9 Sel de dipotassium de l'acide éthylènediaminetétraacétique** (K₂EDTA) (C₁₀H₁₄N₂O₈K₂).
- A.1.1.5.10 Hydroxyde de potassium** (KOH).
- A.1.1.5.11 Chlorure de potassium** (KCl).
- A.1.1.5.12 Dodécyl sulfate de sodium** (SDS) (C₁₂H₂₅O₄SNa).
- A.1.1.5.13 Protéinase K**, environ 20 Unités/mg de lyophilisat.
- A.1.1.5.14 RNase-A**, exempte de DNase, extraite de pancréas de bovin contenant environ 50 Unités de type Kunitz par mg de lyophilisat.
- A.1.1.5.15 Phénol équilibré**, pH > 7,8.

Utiliser du phénol équilibré par rapport au tampon d'extraction (A.1.1.5.18) sans dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou préparé conformément à la Référence [5] ou aux recommandations du fabricant.

A.1.1.5.16 Chloroforme-alcool isoamylique

Mélanger 24 volumes de chloroforme (A.1.1.5.7) avec 1 volume d'alcool isoamylique (A.1.1.5.5).

A.1.1.5.17 Phénol-chloroforme-alcool isoamylique

Mélanger 1 volume de phénol équilibré (A.1.1.5.15) avec 1 volume de chloroforme-alcool isoamylique (A.1.1.5.16).

A.1.1.5.18 Tampon d'extraction/de lyse, concentration molaire c (TRIS) = 0,050 mol/l, c (K₂EDTA) = 0,050 mol/l, concentration massique ρ (SDS) = 30 g/l.

Ajuster le pH à 8,0 à l'aide de HCl ou de KOH.

A.1.1.5.19 Tampon TE, c (Tris) = 0,010 mol/l, c (K₂EDTA) = 0,001 mol/l.

Ajuster le pH à 8,0 à l'aide de HCl ou de KOH.

A.1.1.5.20 Solution de protéinase K, ρ = 20 mg/ml, dissoute dans de l'eau stérile.

Ne pas autoclaver. Stocker à -20 °C en évitant de congeler et de décongeler plusieurs fois.

A.1.1.5.21 Solution de RNase-A, lyophilisat ρ (RNase-A) = 10 mg/ml.

Stocker à -20 °C en évitant de congeler et de décongeler plusieurs fois.

A.1.1.5.22 Solution d'éthanol, ϕ (C₂H₅OH) = 70 %.

Stocker et utiliser à -20 °C.