

Première édition
2005-06-15

AMENDEMENT 1
2013-04-01

**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**

iTeh STANDARD PREVIEW
AMENDEMENT 1
(standards.iteh.ai)

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e420-4bfc-bab7-3719261d80/iso-21569-2005-amd-1-2013>

AMENDMENT 1



Numéro de référence
ISO 21569:2005/Amd.1:2013(F)

© ISO 2013

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21569:2005/Amd 1:2013
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e420-4bfc-bab7-371926bcbf00/iso-21569-2005-amd-1-2013>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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

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

L'Amendement 1 à l'ISO 21569:2005 a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e420-4bfc-bab7-371926bcbf00/iso-21569-2005-amd-1-2013>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21569:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e420-4bfc-bab7-371926bcbf00/iso-21569-2005-amd-1-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e420-4bfc-bab7-371926bcbf00/iso-21569-2005-amd-1-2013>

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

AMENDEMENT 1

Dans le présent amendement, la numérotation des notes de bas de page n'a pas fait l'objet d'une mise à jour permettant de l'adapter à la numérotation adoptée dans l'ISO 21569:2005. Les renvois de note de bas de page indiqués sont donnés pour utilisation uniquement comme références au sein du présent amendement.

Page v, Introduction, alinéa 1

Supprimer le premier élément de la liste:

«— Échantillonnage (ISO 21568),»

Page 1, Article 2, ISO 24276

Supprimer la note de bas de page et mettre à jour la référence pour lire:

ISO 24276:2006, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Exigences générales et définitions*

Page 2, 4.1, alinéa 1

Remplacer le texte existant par le texte suivant.

«Un résultat qualitatif doit clairement indiquer la présence ou l'absence de l'élément génétique à l'étude, recherchée à l'aide de témoins appropriés.

NOTE Les limites de détection et la taille de la prise d'essai sont des aspects critiques d'une méthode.»

Page 5, 7.3.3.3.3, alinéa 2

Supprimer «représentatif» et remplacer par «approprié» de manière à lire le texte qui suit.

«Il convient de démontrer que les amorces conçues pour détecter les séquences cibles spécifiques au taxon sont capables de détecter de manière fiable ces séquences dans un nombre approprié de membres différents du taxon.»

Page 5, 8.1 a) et b)

Remplacer «ISO 24276:—» par «ISO 24276:2006».

Page 7, 9.4

Remplacer le texte existant par le texte suivant.

«Les résultats obtenus avec la même prise d'essai doivent être cohérents. En cas de résultats +/- pour les deux répétitions, répéter les deux PCR pour la prise d'essai correspondante. Si les deux nouvelles répétitions donnent des résultats +/- ou -/-, la prise d'essai est considérée comme négative.

Les résultats obtenus avec toutes les prises d'essai doivent être cohérents. Lorsqu'au moins une prise d'essai donne un résultat positif et qu'au moins une autre donne un résultat négatif, l'analyse doit être répétée.

Si au moins une répétition du mode opératoire, commençant par l'extraction des acides nucléiques, donne des résultats ambigus, tels qu'un résultat positif et un résultat négatif, il convient que le rapport indique que l'échantillon est négatif à la limite de détection (LOD).»

Page 7, Article 10, deuxième élément de la liste

Remplacer le texte existant par le texte suivant.

«— la spécificité de la méthode analytique (événements spécifiques, construit spécifique ou méthode de criblage);»

Page 24, Annexe A

Insérer A.5 et A.6 après le texte existant.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

A.5 Méthodes spécifiques au taxon pour la détection d'ADN dérivés du riz

A.5.1 Objet, pertinence et base scientifique

Le Laboratoire de détection d'OGM de l'Université Jiao Tong de Shanghai (GMDL-SJTU) a organisé un essai interlaboratoires pour valider l'applicabilité d'une méthode spécifique au taxon utilisant le gène codant la saccharose phosphate synthase (*SPS*) du riz comme gène endogène pour l'analyse qualitative du riz génétiquement modifié (GM) ou non génétiquement modifié (non-GM). Douze laboratoires situés en Espagne, en Corée, en Lituanie, en Slovénie, au Japon, en Italie et en Chine ont participé à cet essai.

Le mode opératoire de l'essai interlaboratoires comportait les modules suivants:

- PCR qualitative pour la validation de l'hétérogénéité du gène *SPS* parmi des cultivars de riz de différentes origines géographiques et phylogénétiques;
- PCR qualitative pour la validation de la spécificité à l'espèce riz du gène *SPS*;
- PCR qualitative pour l'évaluation de la LOD du test PCR qualitatif établi pour le *SPS*.

L'essai interlaboratoires a été réalisé conformément à la Référence [44].

Les résultats de l'essai interlaboratoires ainsi que le protocole associé sont donnés en A.5.3.

A.5.2 Principe

La méthode a été optimisée pour les semences de riz, et d'autres produits transformés comme la poudre issue de semences. L'applicabilité du gène *SPS* a été évaluée dans le cadre de cet essai interlaboratoires en utilisant des échantillons d'ADN extraits de semences de riz et d'autres plantes.

L'organisateur de l'essai interlaboratoires a fourni aux participants les réactifs spécifiques à la méthode (amorces, sondes, mélange réactionnel maître) et les échantillons d'ADN pour essai extraits de produits à base de riz.

A.5.3 État de validation et critères de performance

A.5.3.1 Robustesse de la méthode

La robustesse a été évaluée sur un système de PCR qualitative pour le gène *SPS* pour trois températures d'hybridation différentes (à savoir 56 °C, 58 °C et 60 °C), sur trois échantillons d'ADN différents contenant des quantités connues d'ADN de riz (échantillons d'ADN de génome de riz de 10 ng, 1 ng, 0,1 ng) et avec trois répétitions par échantillon. Les systèmes de PCR qualitative ont démontré qu'ils présentaient la robustesse attendue et ont bien fonctionné aux trois températures d'hybridation et aux trois concentrations des échantillons d'ADN de riz.

Le système de PCR qualitative pour le gène *SPS* a également été évalué sur différents thermocycleurs (PTC-100¹, MJ Research et instruments de Bio-Rad et Applied Biosystems), sur trois volumes réactionnels différents (25 µl, 30 µl et 50 µl) et avec trois répétitions par volume. Les systèmes de PCR qualitative ont présenté la robustesse attendue et ont bien fonctionné sur différents thermocycleurs et avec différents volumes réactionnels.

A.5.3.2 Essai intralaboratoire

Le gène *SPS* du riz a été décrit comme étant adapté à une utilisation en tant que gène endogène de référence dans l'identification et la quantification du riz (Référence [44]). Les informations techniques détaillées ont été modifiées par rapport à la Référence [44].

Pour la préparation des échantillons dans le cadre de l'essai interlaboratoires, tous les échantillons d'ADN ont été extraits au laboratoire GMDL-SJTU par la méthode employant le CTAB décrite dans l'ISO 21571:2005, A.3. La quantification spectrophotométrique de l'ADN extrait a été réalisée par une méthode décrite dans l'ISO 21571:2005, B.1. Après la quantification de l'ADN, une PCR qualitative a été réalisée à l'aide du système de PCR 18S (Référence [45]) pour obtenir des données sur une éventuelle inhibition de la PCR.

Le système de PCR pour le gène *SPS* a été soumis à essai en utilisant de l'ADN génomique de riz par trois chercheurs du laboratoire GMDL-SJTU. Les résultats ont été satisfaisants; en particulier, pour la PCR qualitative, les résultats ont montré que le gène *SPS* est spécifique pour le riz et que la LOD est d'environ 0,1 %.

A.5.3.3 Essai interlaboratoires

Dans le cadre de l'essai interlaboratoires, chaque participant a reçu douze échantillons d'ADN de riz pour l'essai d'hétérogénéité; dix échantillons d'ADN provenant de plantes autres que le riz plus un échantillon d'ADN provenant de riz pour les essais de spécificité à l'espèce; et dix échantillons de riz dilués en série pour l'évaluation de la LOD. Un témoin négatif et un témoin positif étaient également inclus.

L'hétérogénéité du gène *SPS* parmi des cultivars de riz a été évaluée en utilisant douze cultivars de riz de différentes origines géographiques et phylogénétiques en Chine, tels que Najing14, Taibei309, Shengnong265, Jinyinbao, Minghui78, Huke3, Guangluai4, Zhe733, Hejiang19, Baizhehu, Xiangwanxian9 et Nipponbare. Les résultats renvoyés par les douze laboratoires ont montré que sur un total de 144 (12 × 12) échantillons d'ADN de riz, 143 résultats positifs ont été obtenus en utilisant le système de PCR pour le gène *SPS*. Cela signifie que le taux de faux négatif du système de PCR pour le gène *SPS* du riz est de 0,69 % (1/144) (voir Tableau A.14). Ces données suggèrent qu'il existe une faible hétérogénéité du gène *SPS* dans la région cible.

1) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Tableau A.14 — Résultats des essais d'hétérogénéité et de spécificité de la PCR qualitative

Paramètre (Essai interlaboratoires de 2007)	Valeur
Nombre de laboratoires	12
Nombre de laboratoires présentant des résultats	12
Nombre d'échantillons par laboratoire	22
Nombre de résultats acceptés	264
Nombre d'échantillons contenant du riz	144
Nombre d'échantillons ne contenant pas de riz	120
Faux positifs	2 (1,67 %)
Faux négatifs	1 (0,69 %)

La spécificité à l'espèce du gène *SPS* a été validée en utilisant un échantillon d'ADN génomique de riz (Guangluai4) et dix ADN d'autres plantes liées d'un point de vue évolutif au riz, de plantes cultivées courantes ou de plantes modèles, tels que les fruits du bambou (*Phyllostachys* spp.), la sétaire verte [*Setaria viridis* (L.) Beauv.], l'orge (*Hordeum vulgare*), le blé (*Triticum aestivum*), le millet des oiseaux (*Setaria italica*), le colza (*Brassica napus*), la tomate (*Lycopersicon esculentum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), le soja (*Glycine max*) et l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*). Les résultats renvoyés par les douze laboratoires ont montré que sur un total de 120 (10 × 12) échantillons d'ADN provenant de plantes autres que le riz, 118 résultats négatifs ont été obtenus en utilisant un système PCR pour le gène *SPS*. Cela signifie que le taux de faux positif du système de PCR pour le gène *SPS* pour les dix autres plantes est de 1,67 % (2/120) (voir Tableau A.14). Ces données suggèrent que le gène *SPS* est spécifique à l'espèce pour la détection du riz.

La LOD du système de PCR pour le gène *SPS* a été validée en utilisant une poudre mélangée contenant du maïs et différentes quantités de semences de riz au moyen d'une PCR qualitative. Les douze laboratoires ont détecté le gène *SPS* dans l'échantillon d'ADN extrait de la poudre mélangée contenant 0,1 % (fraction massique) ou plus de riz, et deux des douze laboratoires l'ont détecté dans la poudre de riz mélangée contenant 0,01 % (fraction massique) de riz. Ces données suggèrent que la LOD du système de PCR pour le gène *SPS* est aussi faible que 0,1 % (fraction massique) (voir Tableau A.15).

Tableau A.15 — Résultats de l'essai de limite de détection de la PCR qualitative

Paramètre (Essai interlaboratoires de 2007)	Fraction massique riz sur maïs, $m_{\text{riz}}/m_{\text{maïs}}$				
	10 %	1 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
Nombre de laboratoires	12	12	12	12	12
Nombre de laboratoires présentant des résultats	12	12	12	12	12
Nombre d'échantillons par laboratoire	2	2	2	2	2
Nombre de résultats acceptés	12	12	12	12	12
Résultats positifs	12 (100 %)	12 (100 %)	12 (100 %)	4 (33,33 %)	2 (16,67 %)

A.5.3.4 Sélectivité moléculaire

A.5.3.4.1 Généralités

Pour la validation qualitative du gène *SPS* comme gène spécifique du riz, un fragment de 279 bp de la région conservée du gène *SPS* a été sélectionné et amplifié en utilisant des amorces spécifiques.

A.5.3.4.2 Aspects expérimentaux

Des échantillons d'ADN extraits de onze plantes différentes (y compris le riz) ont été analysés par le système de PCR pour le gène *SPS* comme décrit dans la Référence [44]. Parmi les onze échantillons, seul l'ADN du riz a donné des résultats positifs. Les dix autres échantillons (voir A.5.3.3) ont donné des résultats négatifs.

Les échantillons d'ADN extraits de douze cultivars de riz différents ont été analysés par le système de PCR pour le gène *SPS* décrit dans la Référence [44]. Les douze échantillons ont donné des résultats positifs.

A.5.3.4.3 Aspects théoriques

La spécificité théorique de l'amorce du gène *SPS* a été évaluée par une recherche d'homologie à l'aide du programme BLASTN 2.0MP-WashU (Référence [82], date de la recherche: 2010-01-09). La séquence de 279 bp utilisée comme requête fait partie du numéro de référence NCBI U33175 (nucléotides 1055-1333). Les résultats de la recherche effectuée avec l'outil d'alignement local (BLAST) ont confirmé une homologie totale de la séquence avec la séquence du gène *SPS* du riz, et l'absence d'homologie avec d'autres gènes et espèces.

A.5.4 Principe et résumé

Cette méthodologie est un mode opératoire de PCR pour l'applicabilité du gène *SPS* à une utilisation en tant que gène endogène du riz dans la détection qualitative de riz génétiquement modifié ou de riz non génétiquement modifié. L'hétérogénéité, la spécificité à l'espèce du gène *SPS* et la limite de détection ont été évaluées dans le cadre de la validation de cette méthode. Le produit PCR de 279 bp a été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose.

A.5.5 Termes et Définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 5725-1^[40] et l'ISO 24276 s'appliquent.

A.5.6 Type et quantités d'échantillon

Dans ce qui suit, les données obtenues dans le cadre de l'essai interlaboratoires sont indiquées à titre d'exemples pour les types et quantités d'échantillon adéquats pour la présente méthode.

Des échantillons d'ADN extraits des semences de douze cultivars de riz, de dix autres plantes (voir A.5.3.3) et d'une poudre mélangée contenant différentes fractions massiques de riz dans une poudre de semences de maïs, ont été utilisés dans le cadre de cet essai interlaboratoires.

Les participants ont reçu les échantillons suivants.

- Douze échantillons d'ADN provenant de douze cultivars de riz différents qui sont largement plantés dans différentes régions de Chine (à savoir Najing14, Taibei309, Shengnong265, Jinyinbao, Minghui78, Huke3, Guangluai4, Zhe733, Hejiang19, Baizhehu, Xiangwanxian9 et Nipponbare.), 20 ng/μl, de 50 μl chacun. Ces échantillons d'ADN ont été utilisés pour valider l'hétérogénéité du gène *SPS* parmi des cultivars de riz.
- Onze échantillons d'ADN provenant de riz (Guangluai4) et de dix autres plantes qui sont liées au riz (à savoir bambou, sétaire verte, orge, blé, millet des oiseaux) ou de plantes cultivées courantes génétiquement modifiées (à savoir colza, tomate, pomme de terre et soja) ou de plantes modèles (à savoir arabette des dames), 20 ng/μl, de 50 μl chacun. Ces échantillons d'ADN ont été utilisés pour valider la spécificité à l'espèce riz du gène *SPS*.
- Dix échantillons d'ADN provenant des poudres de maïs contenant différentes fractions massiques de riz, 20 ng/μl, de 50 μl chacun. Ces échantillons d'ADN étaient des répétitions en double aveugle de la série de cinq concentrations de riz utilisée pour évaluer la LOD du système de PCR pour le gène *SPS*.
- Un témoin négatif d'ADN cible (étiqueté N): ADN de sperme de saumon (20 ng/μl).

- Un témoin positif d'ADN cible (étiqueté P): ADN génomique de riz (Guangluai4) (20 ng/μl). Tous les échantillons d'ADN ont été purifiés en utilisant la méthode CTAB par le laboratoire GMDL-SJTU. Les témoins négatif et positif d'ADN cible ont été utilisés pour chaque plaque de PCR.
- Réactifs, amorces pour le système de PCR pour le gène *SPS* comme suit:
 - paire d'amorces pour PCR conventionnelle: SPS-F/SPS-R;
 - solution de dilution de l'ADN [tris-EDTA (TE) 0,1×, 1,2 ml].

A.5.7 Limite de détection et domaine d'utilisation

L'ADN a été extrait de cinq échantillons de poudre mélangée contenant différentes quantités de riz. Ces résultats ont été analysés en utilisant le système PCR pour le gène *SPS* tel que décrit (Référence [44]). Des résultats positifs ont été obtenus avec les échantillons contenant des fractions massiques de riz de 10 %, 1 %, et 0,1 %. Les deux autres échantillons (contenant des fractions massiques de 0,05 % et 0,01 %) ont donné des résultats négatifs.

Selon la méthode développée, la LOD relative de la méthode PCR qualitative est d'environ 0,1 % (fraction massique). Le système de PCR pour le gène *SPS* peut être utilisé pour la détection et l'identification spécifiques du riz dans d'autres produits d'origine végétale.

A.5.8 Estimation de l'incertitude de mesure

La reproductibilité de la méthode est donnée par les résultats de l'essai interlaboratoires (voir A.5.3.3).

A.5.9 Interférences

Dans les études menées, aucune information complémentaire n'est donnée concernant des interférences observées.

A.5.10 Conditions physiques et environnementales

Voir l'ISO 24276 pour des informations détaillées. Par exemple:

- respecter des zones de travail strictement séparées pour la préparation de l'ADN, la réaction PCR, l'amplification par PCR et l'électrophorèse;
- il convient d'éliminer tout ADN résiduel de tous les équipements avant leur utilisation;
- pour éviter toute contamination, utiliser des embouts de pipette à filtre protégés contre les aérosols;
- utiliser uniquement des gants non poudrés et les changer fréquemment.

A.5.11 Appareillage et matériel

A.5.11.1 Microcentrifugeuse.

A.5.11.2 Congélateur fonctionnant à -20 °C et réfrigérateur fonctionnant à 4 °C.

A.5.11.3 Micropipettes.

A.5.11.4 Agitateur-mélangeur, par exemple agitateur-mélangeur vortex.

A.5.11.5 Microtubes à centrifuger, de capacités 0,2 ml, 1,5 ml et 2,0 ml.

A.5.11.6 Embouts et embouts résistant aux aérosols pour micropipettes.

A.5.11.7 Râtelier pour tubes de réaction.

A.5.11.8 Gants en vinyle ou en latex.

A.5.11.9 Équipement d'amplification d'ADN (thermocycleur ou appareil équivalent).

A.5.11.10 Équipement d'électrophorèse, avec alimentation.

A.5.11.11 Système d'imagerie, pour analyse du gel.

A.5.11.12 Four à micro-ondes (facultatif).

A.5.12 Réactifs et matériaux

A.5.12.1 Généralités

Sauf indication contraire, uniquement des réactifs conformes aux spécifications de l'ISO 24276 et uniquement de l'eau de qualité pour biologie moléculaire ou de l'eau de pureté équivalente ont été utilisés.

A.5.12.2 PCR qualitative

A.5.12.2.1 Tampon pour PCR (sans MgCl₂) 10×.

A.5.12.2.2 Solution de MgCl₂, 25 mmol/l.

A.5.12.2.3 Solution de dNTP, 2,5 mmol/l (chaque).

A.5.12.2.4 Amorces (voir Tableau A.16).

A.5.12.2.5 ADN polymérase, thermostable.

A.5.12.3 Électrophorèse

Pour des informations détaillées, se reporter, par exemple, à l'ISO 21571:2005, B.1.

A.5.12.3.1 Tampon de charge (10 g/l de dodécyl sulfate de sodium, 500 g/l de glycérol, 0,5 g/l de bleu de bromophénol) 10×.

A.5.12.3.2 Étalon de taille d'ADN.

A.5.13 Collecte, transport, conservation et stockage des échantillons

Les solutions d'ADN peuvent être conservées à 4 °C pendant une semaine au maximum ou à -20 °C pour un stockage à long terme.

A.5.14 Préparation de l'échantillon pour essai

S'assurer que l'échantillon pour essai est représentatif de l'échantillon pour laboratoire, par exemple par broyage ou homogénéisation. Les mesures et étapes opératoires à prendre en considération sont décrites dans l'ISO 21571 et l'ISO 24276.

A.5.15 Étalonage des instruments

Il convient d'étalonner les instruments, par exemple les thermocycleurs et les pipettes, conformément à l'ISO/CEI 17025^[41].

A.5.16 Étapes de l'analyse

A.5.16.1 Préparation de l'ADN pour une PCR qualitative

Extraire l'ADN des échantillons en utilisant une méthode d'extraction appropriée, par exemple la méthode d'extraction employant le CTAB décrite dans l'ISO 21571:2005, A.3. Décongeler, mélanger doucement et centrifuger les échantillons d'ADN nécessaires à l'analyse. Maintenir les réactifs décongelés à une température de 1 °C à 4 °C sur de la glace.

A.5.16.2 Réactifs PCR

A.5.16.2.1 Mélange maître conventionnel pour PCR

Mélange réactionnel conventionnel pour PCR contenant les éléments suivants: tampon pour PCR 1×, 200 µmol/l de chaque dNTP, 2,5 mmol/l de Mg²⁺, 330 nmol/l d'amorce sens/antisens, 1 unité de *Taq* polymérase.

A.5.16.2.2 Amorces

Voir Tableau A.16.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Tableau A.16 — Séquences d'amorces oligonucléotidiques pour PCR qualitative

Nom	Séquence d'ADN oligonucléotidique (5' à 3')
Séquence d'amorce pour PCR qualitative	
Amorce SPS F	TTg CgC CTg AAC ggA TAT
Amorce SPS R	ggA gAA gCA CTg gAC gAgg

A.5.16.3 Mode opératoire

A.5.16.3.1 Généralités

La PCR qualitative pour le gène *SPS* du riz a été développée pour un volume total de 30 µl par mélange réactionnel. Il est recommandé d'utiliser 100 ng d'ADN matrice par puits de réaction.

Décongeler, mélanger doucement et centrifuger le mélange maître pour PCR nécessaire à l'analyse. Maintenir les réactifs décongelés à une température de 1 °C à 4 °C sur de la glace.

Répartir le mélange maître dans des tubes de réaction PCR de 200 µl, à raison de 25 µl/tube. Introduire respectivement dans les tubes 5 µl des solutions d'ADN échantillons, du témoin de riz positif, du témoin négatif et du témoin de blanc (eau).

Agiter doucement les tubes PCR, centrifuger dans la microcentrifugeuse à 1 000 × *g* pendant 10 s.

Installer la plaque dans l'instrument.

Réaliser la PCR dans les conditions de cycles pour PCR qualitative.

A.5.16.4 Témoins de PCR

Voir 7.5 et l'ISO 24276.

A.5.16.5 Programme d'amplification

Le test PCR a été optimisé pour une utilisation dans un thermocycleur PTC-100¹⁾ (MJ Research) et un thermocycleur ABI 2720¹⁾ (Applied Biosystems). Bien que d'autres machines PCR puissent être utilisées, il peut être nécessaire de vérifier les conditions de cycle thermique. Les paramètres de cycle pour PCR qualitative sont indiqués dans le Tableau A.17.

Tableau A.17 — Programme d'amplification pour PCR qualitative

Étape	Phase	Température °C	Durée s	Nombre de cycles
1	Activation et dénaturation initiale	94	900	1×
2a	Amplification	Dénaturation	94	30
2b		Hybridation	58	30
2c		Élongation	72	30
3	Élongation finale	72	420	1×

A.5.16.6 Détection

Une fois le programme PCR terminé, introduire 3 µl de tampon de charge 10× dans chaque tube de réaction et mélanger avec les produits de PCR.

Charger respectivement 10 µl de chaque produit de PCR sur un gel d'électrophorèse (20 g/l d'agarose, 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium).

Placer le gel dans l'équipement d'électrophorèse sous une tension de 5 V/cm pendant 20 min.

Enregistrer l'image du gel à l'aide d'un système de documentation sur les gels UV ou d'un système similaire.

Il convient qu'un fragment de 279 bp soit le produit spécifique; les autres bandes existant dans l'électrophorèse sur agarose sont des produits inattendus.

A.5.16.7 Critères d'acceptation ou de rejet

Les exigences de performance de la méthode utilisées pour évaluer les résultats de l'essai interlaboratoires sont les suivantes.

Il convient qu'un fragment de 279 bp soit détecté dans le témoin positif de riz (échantillon P) et qu'aucun fragment cible ne soit détecté dans le témoin négatif (échantillon N) et le blanc. La détection de fragments dont la taille est de 279 bp indique que la solution d'ADN échantillon contient de l'ADN amplifiable de SPS, et le résultat est positif, sinon le résultat est négatif.

A.5.17 Identification de l'échantillon

Il convient d'identifier tous les échantillons sans ambiguïté.

A.5.18 Interprétation et calcul des résultats

La longueur attendue de l'amplicon de SPS est de 279 bp.

Il convient qu'un fragment de 279 bp soit détecté dans le témoin positif de riz (échantillon P) et qu'aucun fragment cible ne soit détecté dans le témoin négatif (échantillon N) et le blanc. La détection de fragments dont la taille est de 279 bp indique que la solution d'ADN échantillon contient de l'ADN amplifiable de SPS, et le résultat est positif, sinon le résultat est négatif.

A.6 Méthode spécifique au taxon pour la détection de composés dérivés de la tomate

A.6.1 Objet, pertinence et base scientifique

Le gène *LAT52* code une protéine glycosylée, riche en cystéine, thermostable, qui est nécessaire au développement du pollen de la tomate. Le système de détection de *LAT52* s'est avéré approprié pour une utilisation en tant que gène spécifique aux espèces dans l'identification et la quantification des tomates génétiquement modifiées (Référence [46]). Le Laboratoire de détection d'OGM de l'Université Jiao Tong de Shanghai (GMDL-SJTU) a organisé un essai interlaboratoires pour valider l'applicabilité du gène *LAT52* de la tomate comme gène endogène spécifique aux espèces pour l'analyse qualitative de la tomate génétiquement modifiée (GM) ou non génétiquement modifiée (non-GM). Treize laboratoires situés aux États-Unis, à Singapour, en Corée, en Lituanie, en Slovénie, en Norvège, en Italie et en Chine ont participé à cet essai (Référence [47]). Les résultats sont indiqués dans le Tableau A.18 et le Tableau A.19.

Le mode opératoire de l'essai interlaboratoires comportait les modules suivants:

- PCR qualitative pour la validation de l'hétérogénéité du gène *LAT52* parmi des cultivars de tomate de différentes origines géographiques et phylogénétiques;
- PCR qualitative pour la validation de la spécificité à l'espèce tomate du gène *LAT52*;
- PCR qualitative pour l'évaluation de la LOD du test PCR qualitatif établi pour le *LAT52*.

L'essai interlaboratoires a été réalisé conformément aux lignes directrices suivantes reconnues à l'échelle internationale:

- ISO 5725-2^[39], notamment pour ce qui concerne le mesurage de la fidélité (c'est-à-dire répétabilité et reproductibilité) et de la justesse;
- le protocole pour la conception, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes de l'UICPA (Référence [48]).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e420-4bfc-bab7-371926bcbf00/iso-21569-2005-amd-1-2013>

A.6.2 Principe

La présente méthode décrit la détection d'ADN de tomate par PCR qualitative.

La méthode a été optimisée pour les semences de tomate, les tomates, le ketchup de tomates, le jus de tomates et d'autres produits transformés dérivés de la tomate. L'applicabilité du gène *LAT52* a été évaluée dans le cadre d'un essai interlaboratoires en utilisant des échantillons d'ADN extraits de semences de tomate et d'autres plantes.

A.6.3 État de validation et critères de performance

A.6.3.1 Robustesse de la méthode

La robustesse du système de PCR qualitative pour le gène *LAT52* a été évaluée par le développeur de la méthode en utilisant trois températures d'hybridation différentes (à savoir 56 °C, 58 °C et 60 °C), sur trois échantillons d'ADN différents contenant des quantités connues d'ADN de semences de tomate (échantillons d'ADN génomique de tomate de 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, et trois répétitions par échantillon). Les systèmes de PCR qualitative ont démontré qu'ils présentaient la robustesse attendue et ont fonctionné de manière satisfaisante aux trois températures d'hybridation et aux trois concentrations des échantillons d'ADN de tomate.

Le système de PCR qualitative pour *LAT52* a également été soumis à essai par le développeur de la méthode sur différents thermocycleurs [PTC-100¹] de MJ Research, S1000¹] de Bio-Rad et ABI 9700¹] d'Applied Biosystems] et avec trois volumes réactionnels différents (25 µl, 30 µl et 50 µl, et trois répétitions par volume). Le système de PCR qualitative a démontré qu'il présentait la robustesse attendue lorsqu'il est utilisé sur différents thermocycleurs et avec différents volumes réactionnels.

A.6.3.2 Essai intralaboratoire

Le gène *LAT52* de la tomate a été validé comme étant adapté à une utilisation en tant que gène spécifique à l'espèce dans l'identification et la quantification d'une tomate génétiquement modifiée (Référence [46]). Les informations techniques détaillées fournies dans le présent document ont été modifiées par rapport à la Référence [46].

Pour la préparation des échantillons en vue de l'étude de validation, les échantillons d'ADN ont été extraits au laboratoire GMDL-SJTU par la méthode employant le CTAB décrite dans l'ISO 21571:2005, A.3. La quantification spectrométrique de l'ADN total extrait a été réalisée par une méthode décrite dans l'ISO 21571:2005, B.1. Après la quantification de l'ADN, un test PCR qualitatif a été réalisé à l'aide du système de PCR 18S pour obtenir des données sur une éventuelle inhibition de la PCR (Référence [49]).

Le système de PCR pour *LAT52* a été soumis à essai par trois opérateurs au laboratoire GMDL-SJTU en utilisant de l'ADN génomique de tomate donnant des résultats satisfaisants et cohérents; en particulier, lors de la PCR qualitative, les résultats ont montré que le gène *LAT52* est spécifique à la tomate, et la LOD est d'au moins 0,1 % (fraction massique).

A.6.3.3 Essai interlaboratoires

L'hétérogénéité du gène *LAT52* parmi des cultivars de tomate a été évaluée à l'aide de douze cultivars de tomate de différentes origines géographiques et phylogénétiques en Chine, tels que Shengnong2, Jifan4, Zhongsu5, Yashu6, Jiafen1, Shenfeng2, Hongza9, R144, Nongyou30, Dongnong704, Lichun et Zaokui. Les résultats renvoyés par les treize laboratoires ont montré que sur un total de 156 (12 × 13) échantillons d'ADN de tomate, 155 résultats positifs ont été obtenus en utilisant le système de PCR pour le gène *LAT52*. Par conséquent, le taux de faux négatif du système de PCR pour le gène *LAT52* de la tomate est de 0,64 % (1/156) (voir Tableau A.18). Ces données suggèrent que le gène *LAT52* a une faible hétérogénéité parmi les cultivars de tomate provenant de Chine.

ISO 21569:2005/Amd.1:2013
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1edf8abc-e426-4b1c-bab7-371926bcbf00/iso-21569-2005-amd-1-2013>

Tableau A.18 — Résultats de la PCR qualitative

Paramètre (Essai interlaboratoires de 2007)	Valeur
Nombre de laboratoires	13
Nombre de laboratoires présentant des résultats	13
Nombre d'échantillons par laboratoire	22
Nombre de résultats acceptés	286
Nombre d'échantillons contenant de la tomate	156
Nombre d'échantillons ne contenant pas de tomate	130
Faux positifs	4 (3,08 %)
Faux négatifs	1 (0,64 %)

La spécificité à l'espèce du gène *LAT52* a été validée en utilisant un échantillon d'ADN génomique de tomate (Jiafen1) et dix ADN d'autres plantes liées d'un point de vue évolutif à la tomate ou de plantes cultivées courantes génétiquement modifiées ou de plantes modèles, tels que l'aubergine (*Solanum melongena*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), le poivron (*Capsicum annuum*), le maïs (*Zea mays*), le soja (*Glycine max*), le colza (*Brassica rapa*), le riz (*Oryza sativa*), les feuilles de pétunia (*Petunia hybrida*), le tabac (*Nicotiana tabacum*) et l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*). Les résultats renvoyés par les treize laboratoires ont montré que sur un total de 130 (10 × 13, sans échantillon d'ADN de tomate) échantillons d'ADN de différentes plantes, 126 résultats négatifs ont été obtenus en utilisant le système de PCR pour le gène *LAT52*. Par conséquent, le taux de faux positif du système de PCR pour le gène *LAT52* est de 3,08 % (4/130) (voir Tableau A.18). Les faux positifs peuvent être liés à la contamination lors de l'opération de PCR. Ces données suggèrent que le gène *LAT52* est spécifique à l'espèce pour la détection de la tomate.