

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

ISO
21570

Первое издание
2005-11-01
ИЗМЕНЕНИЕ 1
2013-04-15

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

ИЗМЕНЕНИЕ 1

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc06>

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

AMENDMENT 1

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



Ссылочный номер
ISO 21570:2005/Amd.1:2013(R)

© ISO 2013

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, использованным 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/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2013

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

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.

Изменение 1 к ISO 21570:2005 подготовлено Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты, Подкомитетом SC 16 Горизонтальные методы молекулярного анализа с помощью биомаркеров.*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21570:2005/Amd 1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>

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

ИЗМЕНЕНИЕ 1

В настоящем изменении не стремились привести нумерацию сносок в соответствие с системой, принятой в ISO 21570:2005. Приведенные номера сносок используются исключительно в этом изменении.

Страница 1, Раздел 2

Внести изменения в ссылки 1 – 3 следующим образом и исключить сноску 1).

ISO 21569:2005 + AM1:2013, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на качественном определении нуклеиновых кислот*

ISO 21571:2005 + AM1:2013, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот*

ISO 24276:2006 + AM1:2013, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения*

Страница 3, 7.1, последний абзац; Стр. 8, A.1.5.1; Стр. 15, B.1.5.1; Стр. 23, C.1.5.1; Стр. 31, C.2.5.1; Стр. 38, C.3.5.1; Стр. 46, C.4.5.1; Стр. 53, C.5.5.1; Стр. 61, C.6.5.1; Стр. 69, C.7.5.1; Стр. 77, C.8.5.1; Стр. 85, C.9.5.1; Стр. 92, D.1.5.1; Стр. 99, D.2.5.1

Исключить "ISO 24276:—", вставить "ISO 24276:2006".

Страница 4, Разделы 8–10

Заменить существующий текст следующим.

8 Интерпретация

Результаты ПСР могут быть либо а), либо б).

- а) 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;
 - проведена калибровка аналитической процедуры соответствующим образом (см. 7.3).

- b) непригодными для количественной оценки целевой последовательности, если не соблюдается любое из перечисленных условий в а).

Интерпретация неоднозначных результатов, полученных на одной и той же пробе для анализа: в случае +/- результатов для двух реплик повторяют две ПСР для соответствующей пробы для анализа. Если при испытании двух новых реплик получают результат +/- или -/-, то пробу для анализа считают отрицательной.

Интерпретация неоднозначных результатов, полученных от двух проб для анализа: в случае ± результатов для двух проб для анализа, отобранных от пробы, должны быть выполнены экстракция и анализ двух новых проб для анализа. Если снова получают результаты +/-, то пробу для анализа считают отрицательной в соответствии с ISO 24276:2006, 6.3.

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

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

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

ПРИМЕЧАНИЕ Утверждение, что количество происходящей из ГМО ДНК ниже фактического значения LOQ, сопровождающееся его спецификацией, рассматривается как качественное выражение результата.

9 Выражение результатов

Результаты должны ясно констатировать количество целевой ГМ-последовательности относительно последовательности, специфической для целевого таксона. Результаты должны также содержать значения неопределенности измерения, такие как стандартное отклонение или коэффициент вариации. Кроме того, должны приводиться значения LOD и LOQ метода и фактические значения LOD и LOQ. Следует указать в отчете, что результат относится только к ГМО-мишеням. В случае применения количественного анализа методом скрининга или составных матриц рекомендуется указать, что сигнал ГМО может поступить от нецелевых таксонов.

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, которое должно быть включено в протокол испытания.

Содержание ДНК, происходящей из ГМО, также может указываться как выше или ниже конкретного значения с учетом неопределенности измерения.

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:

- a) значение LOQ метода и материал, с помощью которого он был установлен;
- b) фактическое значение LOQ;
- c) ссылка на метод, который был использован для экстракции ДНК;
- d) ссылка на методы, которые были использованы для амплификации целевых последовательностей ДНК;

- e) использованный стандартный материал;
- f) результаты, выраженные в соответствии с Разделом 9;
- g) мишень ПСР и рассматривается ли метод “специфический для события” или “специфический для конструкции” или “скрининга”;
- h) определение используемой неопределенности измерения.

ПРИМЕЧАНИЕ Для g) и h) информация может фигурировать в других документах (например, в комментариях к контракту, спецификации).

Таблица 1 — Выражение результатов

Результат	Выражение результата
Последовательность, специфическая для целевого таксона, не обнаружена.	“Для вида X, ДНК не обнаружена.”
Последовательность, специфическая для целевого таксона, обнаружена, но не обнаружена целевая GM-последовательность.	<p>В соответствии с ISO 21569.</p> <p>“Для пробы X, целевая GM-последовательность Y не обнаружена. Значение LOD метода составляет x %, определенное с применением ABC (идентифицируют стандартный материал).”</p> <p>Если невозможно продемонстрировать, что размер пробы для испытания и количество целевой ДНК, включенной в ПСР, достаточны для применения значения LOD, то должно быть добавлено следующее предложение: “Однако количество целевой ДНК, экстрагированной из вида X, может быть/было недостаточно для применения значения LOD к этой пробе. Значение LOD пробы составляет x %.” (Указываются использованные единицы.)</p> <p>ПРИМЕЧАНИЕ Значение LOD пробы определяется количеством ДНК вида, включенного в аналитическую реакцию (число копий), и отношением абсолютного значения LOD GM-мишени (число копий) и, в случае зерна и семян, количества зерна или семян в размолотой порции.</p>
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая GM-последовательность, однако количество, по крайней мере, одной из целевых последовательностей ниже значения LOQ.	<p>Для каждого GMO констатируется:</p> <p>“ДНК, происходящая из GMO (специфицируется GMO), обнаруженная с помощью (специфицируется целевая последовательность), полученной из (специфицируется вид), была обнаружена, но ее количество ниже фактического предела количественного определения.”</p> <p>В надлежащих случаях, кроме того, добавляется “Фактический предел количественного определения составляет x %.” (Указываются использованные единицы.)</p>
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая GM-последовательность, и количество обеих целевых последовательностей выше значения LOQ.	<p>Для каждого GMO констатируется:</p> <p>“Содержание ДНК, происходящей из GMO (специфицируется GMO), обнаруженное с помощью (специфицируется целевая последовательность), полученной из (специфицируется вид), составляет $x \pm U_{meas} \%$” где U_{meas} — неопределенность измерения. (Указываются использованные единицы.)</p>

Страница 11, Приложение А

Добавить А.2 и А.3.

A.2 Метод, специфичный для целевого таксона, для определения ДНК, полученной из риса

A.2.1 Принцип

Ген *SPS* из риса был описан как пригодный для использования в качестве эндогенного референсного гена для идентификации и количественного определения GM-риса (Ссылка [59]). Лаборатория по обнаружению ГМО Шанхайского университета (GMDL-SJTU) организовала совместные испытания для валидации применимости гена сахарозофосфат-синтазы (*SPS*) в качестве эндогенного гена для количественного анализа генетически модифицированного (GM) или генетически немодифицированного (non-GM) риса. В совместном исследовании участвовали 12 лабораторий из Испании, Кореи, Литвы, Словении, Японии, Италии и Китая.

Рабочая процедура совместных испытаний состояла из следующих этапов.

Количественный анализ методом ПСР в реальном времени для количественного определения слепых проб ДНК риса, используемых для построения стандартных кривых.

Количественный анализ методом ПСР в реальном времени для количественного определения слепых проб ДНК риса, используя построенные стандартные кривые.

Межлабораторное испытание было проведено в соответствии со следующими руководящими указаниями, принятыми на международном уровне:

- ISO 5725;^{[51]–[56]}
- протоколом IUPAC по разработке, проведению и интерпретации исследований по определению рабочих характеристик метода (Ссылка [12]).

Результаты совместных испытаний, а также соответствующий протокол приводятся в А.2.3.3.

A.2.2 Область применения

Данный метод был оптимизирован для зерен риса и продуктов его переработки, содержащих смеси риса и других матриц, например, кукурузы и сои. Пригодность гена *SPS* была протестирована во время совместных испытаний, используя пробы ДНК, экстрагированной из зерен риса.

A.2.3 Статус валидации и характеристики рабочих параметров

A.2.3.1 Устойчивость метода

Устойчивость количественных систем ПСР в реальном времени для гена *SPS* была протестирована разработчиком метода при различных температурно-временных программах (т.е. двух- и трехэтапных) и трех различных пробах ДНК, содержащих известные количества ДНК риса (пробы генома ДНК риса массой 10 нг, 1 нг и 0,1 нг). Каждая проба анализировалась трижды. Количественные системы ПСР в реальном времени имели ожидаемую надежность и хорошо работали при различных температурно-временных программах и трех концентрациях проб ДНК риса.

Количественная система ПСР для гена *SPS* также была протестирована на различных приборах, использующих метод ПСР в реальном времени (Rotor gene 3000A,¹⁾ Corbett Research и ABI7700,¹⁾ Applied Biosystems), с тремя разными реакционными объемами (20 мкл, 25 мкл и 30 мкл; по три повторности на объем). Количественная система ПСР в реальном времени продемонстрировала соответствующую надежность, хорошую работу на различных приборах, использующих метод ПСР в реальном времени, и с разными реакционными объемами.

1) Это примеры доступных на рынке подходящих продуктов. Приведенная информация дана для удобства пользователей этого международного стандарта и не является подтверждением ISO названного продукта.

A.2.3.2 Межлабораторные испытания

Для приготовления пробы все пробы ДНК были подвергнуты экстракции, используя метод на основе цетил(триметил)аммонийбромида (СТАВ), одобренный в ISO 21571. Спектрометрическое определение количества общей экстрагированной ДНК было выполнено с использованием метода, приведенного в ISO 21571:2005, В.1. После количественного определения ДНК был выполнен количественный прогон методом ПСР в реальном времени для получения данных относительно возможного ингибирования ПСР.

Система ПСР для гена *SPS* была протестирована тремя исследователями с помощью геномной ДНК риса и были получены удовлетворительные результаты; в частности, в количественном анализе методом ПСР, систематическая погрешность была ниже 25 % в динамическом диапазоне (т.е. от 0,05 нг до 1,00 нг).

A.2.3.3 Совместные испытания

Стандартные кривые были построены с использованием последовательно разведенных проб ДНК, экстрагированных в лаборатории GMDL-SJTU из четырех сортов риса при количественном анализе методом ПСР. Эффективность системы ПСР для гена *SPS*, рассчитанная по углу наклона стандартной кривой как $(10^{-1/a} - 1) \times 100$, где a — угол наклона, изменялась от 0,846 3 до 1,223 3, а линейность (коэффициент регрессии, R_c^2) была в среднем равна 0,997.

Результаты для восьми слепых проб ДНК представлены в Таблице А.5. Они оцениваются по критерию приемки метода и требованиям к рабочим характеристикам метода, установленным Европейской сетью лабораторий GMO (ENGL) и одобренным Лабораторией ЕС по определению генетически модифицированных пищевых продуктов и кормов (EU-RL GMFF) (Ссылка [60]). В Таблице А.5 представлены оценки как повторяемости, так и воспроизводимости, для каждого уровня концентрации риса после идентификации и удаления выбросов согласно критерию Кохрена.

Таблица А.5 — Результаты количественного анализа методом ПСР в реальном времени

Параметр	Слепые пробы							
	0,5 нг	0,5 нг	1 нг	1 нг	2 нг	5 нг	5 нг	10 нг
Лаборатории, выдающие результаты	12	12	12	12	12	12	12	12
Образцов на лабораторию	1	1	1	1	1	1	1	1
Число общих данных	108	108	108	108	108	108	108	108
Исключенные данные	4	2	0	8	0	0	0	0
Причина исключения	Критерий Кохрена	Критерий Кохрена	—	Критерий Кохрена	—	—	—	—
Среднее значение	0,407 8	0,412 1	0,814 6	0,734 4	1,857 5	5,261 0	5,445 7	10,889 6
Стандартное отклонение повторяемости	0,058 3	0,071 9	0,143 5	0,111	0,336 2	0,936 4	1,142 7	1,867 7
Коэффициент вариации повторяемости, %	14,29	17,44	17,62	15,11	18,10	17,80	20,98	17,15
Стандартное отклонение воспроизводимости	0,130 2	0,061 8	0,249 6	0,092 7	0,201 3	0,810 9	0,989 6	1,617 5
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	31,92	14,99	30,65	12,63	10,84	15,41	18,17	14,85
Систематическая погрешность, абсолютное значение	0,092 2	0,087 8	0,185 3	0,265 5	0,142 4	-0,261 0	-0,445 8	-0,889 6
Систематическая погрешность, %	-18,44	-17,57	-18,54	-26,53	-7,12	5,22	8,92	8,90

A.2.3.4 Молекулярная специфичность

A.2.3.4.1 Общие положения

Праймеры и зонд, направленно воздействующие на фрагмент ДНК гена *SPS* длиной 81 п.о. (пар нуклеотидных оснований), перечислены в Таблице А.6.

Таблица А.6 — Последовательности олигонуклеотида для праймеров и зонда

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида (5' – 3')
Последовательность для праймеров и зонда при количественном анализе методом ПСР в реальном времени	
SPS праймер F	TTgCgCCTgAACggATAT
SPS праймер R	CggTTgATCTTTTCgggATg
SPS зонд	HEX- TCCgAgCCgTCCgTgCgTC -TAMRA

A.2.3.4.2 Экспериментальная специфичность

Пробы ДНК, экстрагированные из 11 различных растительных материалов (включая рис), были проанализированы с использованием метода ПСР для гена *SPS*. Из 11 проб только проба ДНК риса дала положительные результаты. Оставшиеся 10 проб (т.е. бамбук, шетинник зеленый, ячмень, пшеница, просо итальянское, семена рапса, томат, картофель, соя и *Arabidopsis*) дали отрицательные результаты.

Пробы ДНК, экстрагированные из 12 различных сортов риса, были проанализированы специфическим методом ПСР, разработанным для обнаружения гена *SPS*. Все 12 проб дали положительные результаты.

A.2.3.4.3 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зонда для гена *SPS* была оценена путем поиска подобия с использованием программы BLASTN2.0MP-WashU (Ссылка [64], дата поиска: 2010-01-09). Последовательность длиной 81 п.о., используемая как запрос в базу данных, входит в состав инвентарного номера U33175 (нуклеотиды 1055–1135) Национального центра биотехнологий (NCBI). Результаты поиска подтверждены полной идентичностью запросной последовательности с последовательностью для гена *SPS* риса, и отсутствием подобия с другими генами и видами.

A.2.4 Принцип и резюме

Фрагмент гена *SPS* длиной 81 п.о. амплифицируют с использованием двух рисовых *sps*-специфических праймеров. Накопление продуктов ПСР измеряют в конце каждого цикла ПСР (в реальном времени) с помощью рисового *sps*-специфического олигонуклеотидного зонда, меченого двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя (см. Таблицу А.6). Для этих целей применяют TaqMan®¹⁾ химию. Измеренный сигнал флуоресценции пересекает определяемое пользователем пороговое значение после нескольких циклов. Число этих циклов называют C_T -значением. Для количественной оценки количества рисовой *adh1*-ДНК в неизвестной пробе 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.2.5 Термины и определения

Применительно к этому разделу применяют термины и определения, установленные в ISO 5725-1^[51] и ISO 24276.

A.2.6 Тип и количество пробы

Пробы ДНК, экстрагированные из зерен четырех сортов риса, использовались для построения стандартных кривых в этих совместных испытаниях. Затем анализировались восемь слепых проб с использованием четырех построенных стандартных кривых.

Участники испытаний получили следующие пробы.

- Четыре пробы ДНК различных сортов риса (3M, сорт Indica из США; Balilla, сорт Japonica из Италии; Guangluai, сорт Indica из Южного Китая и Shennong265, сорт Chinese Japonica), 50 нг/мкл, по 30 мкл каждая. Проба ДНК каждого сорта риса была разведена и использована для построения соответствующей стандартной кривой.
- Восемь слепых проб ДНК риса от четырех различных сортов риса различных концентраций (от 0 нг/мкл до ~50 нг/мкл), по 50 мкл каждая.
- Отрицательный контроль целевой ДНК (обозначенный N): ДНК спермы лосося (20 нг/мкл).
- Положительный контроль целевой ДНК (обозначенный P): геномная ДНК (Guangluai4) (20 нг/мкл). Все пробы ДНК подверглись очистке в лаборатории GMDL-SJTU с использованием метода СТАВ. Для каждой чашки ПСР использовались отрицательные и положительные контроли целевой ДНК.
- Праймеры и зонды для системы ПСР гена SPS (см. Таблицу А.6) и следующие дополнительные реактивы:
 - универсальная смесь для постановки ПСР в реальном времени (1 мл × 6);
 - разбавленный раствор ДНК (0,1 × TE, 1,2 мл).

A.2.7 Предел количественного определения (LOQ), диапазон применения

В соответствии с усовершенствованным методом абсолютное значение LOQ составляет 0,01 нг/мкл. Относительное значение LOQ при количественном анализе методом ПСР не оценивалось при проведении совместных испытаний.

A.2.8 Оценка неопределенности измерения

Общая неопределенность метода задается результатами совместных испытаний (см. Таблицу А.5).

A.2.9 Интерференция

Количество нуклеиновой кислоты, используемой в качестве кодирующей нити ДНК для анализа методом ПСР в реальном времени, а также ее способность к амплификации имеют важнейшее значение для чувствительности метода. Помимо этого общего положения, неизвестны специфические интерференции для этого метода.

A.2.10 Физические условия и условия окружающей среды

Для выполнения процедур требуется опыт работы в стерильных условиях.

Рабочие зоны для экстракции ДНК, постановки ПСР и амплификации должны быть четко разделены.

Любые остатки ДНК следует удалять из оборудования перед его использованием.

Для предотвращения контаминации следует использовать наконечники с фильтром для пипеток (А.2.11.6), защищающие от аэрозолей.

Используют только перчатки без присыпки (А.2.11.8) и часто меняют их.