

# 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://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 <math>x \pm U_{meas} \%</math>” где <math>U_{meas}</math> — 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;<sup>[51]–[56]</sup>
- протоколом IUPAC по разработке, проведению и интерпретации исследований по определению рабочих характеристик метода (Ссылка [12]).

Результаты совместных испытаний, а также соответствующий протокол приводятся в A.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,<sup>1)</sup> Corbett Research и ABI7700,<sup>1)</sup> 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®<sup>1)</sup> 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<sup>[51]</sup> 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.