

# МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

**ISO**  
**21571**

Первое издание  
2005-02-15  
**AMENDMENT 1**  
2013-03-15

---

---

**Продукты пищевые. Методы анализа  
для обнаружения генетически  
модифицированных организмов и  
полученных из них продуктов.  
Экстракция нуклеиновых кислот  
ИЗМЕНЕНИЕ 1**

[ISO 21571:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/21571:2005/amd.1:2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/21571:2005/amd.1:2013> *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of  
genetically modified organisms and derived products —  
Nucleic acid extraction*

*AMENDMENT 1*

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



Ссылочный номер  
ISO 21571:2005/Amd.1:2013(R)

© ISO 2013

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 21571:2005/Amd 1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-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](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 21571:2005 подготовлено Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты, Подкомитетом SC 16 Горизонтальные методы молекулярного анализа с помощью биомаркеров.*

iTech STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 21571:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013>



# Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот

## ИЗМЕНЕНИЕ 1

*Страница v, Введение*

Исключить ссылку на ISO 21568.

Заменить ссылку на ISO 24276 следующей:

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

*Страница 1, Раздел 2*

Заменить ссылку на ISO 24276 следующей:

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

Исключить ссылку на Сноску 1) и саму сноску.

Исключить ссылку на ISO 21568.

*Страница 3, 5.1.1, абзац 3, строка 2*

Исключить фразу "(например, 3 000 частиц на LOD 0,1 %), чтобы можно было сделать статистически обоснованный вывод (см. ISO 21568)".

*Страница 3, 5.1.2, абзац 1, строка 2*

Заменить фразу "методиками, описанными в ISO 24276" на "проектированием лаборатории, установленным в ISO 24276:2006, 5.3.2".

*Страница 3, 5.1.2, абзац 2*

Заменить на фразу: "Лабораторные пробы должны быть достаточно гомогенными перед их сокращением или размолотом и отбором пробы для анализа."

*Страница 4, 5.1.2, абзац 4, строки 4 и 7*

Исключить фразы "как установлено в ISO 21568" и "как определено в ISO 21568".

Страница 4, 5.1.2, абзац 8, 1-ое предложение

Заменить на фразу "После такой обработки гомогенизируют всю лабораторную пробу."

Страница 5, 5.2.1

После абзаца 7, который начинается с фразы "Повторно суспендируют ..." вставить следующий пример:

ПРИМЕР Буфер tris/EDTA (TE, 1× или 0,1×), отрегулированный до значения pH 8,0 пригоден для повторного суспендирования или разбавления ДНК.

Страница 6, 5.3.1, абзац 1

Добавить в конце новое предложение:

Следует определить общее количество ДНК, используемой в ПСР, а также необходимо учитывать общее количество целевого таксона ДНК, поскольку нецелевой таксон ДНК может оказывать влияние на эффективность ПСР.

Страница 8, Раздел 6, абзац 2

Заменить фразу в скобках на: "(например, если выполняемый анализ представляет собой реакцию ПСР, качество экстрагированной ДНК следует оценивать, используя соответствующие контроли ПСР)."

Страница 11, A.1.1.6.5

Заменить сноску <sup>2)</sup> на сноску <sup>1)</sup> и перенумеровать ее.

Страница 12, A.1.1.8

Заменить сноску <sup>3)</sup> на сноску <sup>2)</sup> и перенумеровать ее.

Страница 23, A.1.4.2

Исключить абзац 2: "Этот метод, примененный к микробиологическим осадкам после центрифугирования и мицелиальной пленке, был подвергнут международной проверке<sup>[17]</sup>."

Страница 41, после A.5.1.8 добавить A.5.2

## **A.5.2 Метод на основе гуанидина и хлороформа: Протокол для соевого лецитина**

### **A.5.2.1 Назначение, релевантность и научная основа**

Соевый лецитин является часто встречающимся компонентом, который используется во многих пищевых продуктах в качестве эмульгатора. Соевый лецитин можно получить, используя либо генетически модифицированные (GM), либо генетически немодифицированные соевые бобы. Описанный здесь метод можно использовать для экстракции присутствующей в пробе ДНК, чтобы выполнить последовательные анализы ПСР для обнаружения генетически модифицированных последовательностей ДНК, полученных из генетически модифицированных соевых бобов.

Настоящий метод основан на Ссылке [44], а аналогичная методика была валидирована в ходе совместных испытаний, проведенных в Швейцарии. В этом исследовании с целью интерпретации результатов испытания количество экстрагированной ДНК было определено спектрометрическим методом (Ссылка [35], раздел 1.3). Институт химии и ветеринарии (Фрейбург, Германия) провел

дополнительные совместные испытания с участием 12 лабораторий, в которых количество экстрагируемой и амплифицируемой ДНК соевых бобов было определено с помощью количественного анализа методом ПСР в реальном времени. Относительно результатов — см. Ссылку [45].

### A.5.2.2 Область применения

Данный метод описывает методику экстрагирования ДНК из соевых лецитинов растительных сырых масел и масел однократного прессования соответственно. В том случае, если содержание ДНК в пробе низкое, то метод ПСР в реальном времени используют для количественного определения ДНК, выделенной из пробы для анализа, и для расчета фактического предела детектирования экстрагированной ДНК, который может быть реально достигнут при анализе методом ПСР, соответственно.

### A.5.2.3 Статус валидации и характеристики рабочих параметров

#### A.5.2.3.1 Критерии валидации

Метод, описанный в этом подразделе, был валидирован в ходе совместных испытаний по определению количества экстрагируемой и амплифицируемой ДНК сои с применением количественного анализа методом ПСР в реальном времени. Совместные испытания проводились в соответствии с протоколом IUPAC (Ссылка [46]).

#### A.5.2.3.2 Устойчивость метода

Данный метод регулярно использовался надзорными и частными лабораториями по испытанию генетически модифицированных организмов в Германии и Швейцарии более 10 лет, на протяжении которых не возникало никаких проблем по его применению. Хотя отсутствуют данные по специфической устойчивости метода (например, при изменении параметров метода), опыт работы лабораторий показал, что незначительные изменения условий не влияют на рабочие характеристики метода.

#### A.5.2.3.3 Межлабораторные испытания

Материалы, используемые в этих совместных испытаниях, были протестированы в лаборатории разработчика этого метода для определения его межлабораторной прецизионности.

Для оценки прецизионности метода пять экстрактов ДНК от каждого из пяти соевых лецитинов были приготовлены и измерены с использованием ПСР в реальном времени в условиях повторяемости с помощью метода, специфичного для гена соевого лецитина, в соответствии с ISO 21570:2005,<sup>[41]</sup> С.2. Результаты представлены в Таблице А.6.

**Таблица А.6 — Данные межлабораторной валидации для метода экстракции ДНК с использованием пяти проб соевого лецитина ( $n = 5$  экстракций каждой)**

Проба лецитина №	Среднее число копий лецитина	Стандартное отклонение повторяемости, $s_r$ число копий	Коэффициент вариации повторяемости, $C_{V,r}$ %
1	20 464	5 367	26
2	3 203	620	19
3	2 005	306	15
4	6 978	331	5
5	14	8	61

До проведения совместных испытаний ДНК была экстрагирована из пяти коммерческих соевых лецитинов и протестирована на ингибирование реакции ПСР. Экстракты ДНК, приготовленные из каждой пробы, были затем разбавлены, используя буфер ТЕ (1 объем ДНК, разбавленный 4 объемами буфера ТЕ; 1 объем первого разведения ДНК, разбавленный 4 объемами буфера ТЕ, 1 объем второго разведения ДНК, разбавленный 4 объемами буфера ТЕ). Расхождение между расчетным (экстраполированным) значением  $C_t$  неразбавленной пробы ДНК и измеренным значением  $C_t$  каждого разведения ДНК было ниже 0,1, что указывает на то, что препараты ДНК не содержали ингибиторов ПСР.

#### A.5.2.3.4 Совместные испытания

Совместные испытания (испытание на валидацию) были проведены в 12 лабораториях (Ссылка [45]). Были использованы пять проб коммерческих соевых лецитинов. Каждая лаборатория получила 15 закодированных проб и один стандартный образец ДНК для калибровки. Пробы были распределены таким образом, что каждый участник получил по три идентичных пробы каждого их пяти соевых лецитинов. В каждой лаборатории было выполнено по одной экстракции ДНК на пробу. Возвращаемые результаты были присвоены пяти различным пробам лецитина для оценки совместных испытаний.

Экстрагированная ДНК была протестирована с помощью ПСР в реальном времени, амплифицируя последовательность ДНК гена соевого лецитина в соответствии с методом, указанным в ISO 21570:2005,<sup>[41]</sup> С.2. Стандартный образец ДНК для калибровки был приготовлен из соевой муки [ERM BF410a<sup>1</sup>] с использованием Plant Mini Kit<sup>3</sup> (Qiagen, Hilden/Germany), начиная с экстракции СТАВ (см. А.3). Концентрацию ДНК оценивали флуорометрическим методом PicoGreen<sup>3</sup> dsДНК (Ссылка [17]). Стандартные образцы ДНК определяли по числу копий (ср) эквивалентов гаплоидного генома на микролитр. Для расчета была принята масса гаплоидного генома сои равная 1,13 пг. Была приготовлена серия разбавлений в диапазоне от приблизительно 50 000 ср/5 мкл до 80 ср/5 мкл. В семи лабораториях использовали оборудование ABI<sup>3</sup> для ПСР в реальном времени (ABI 7000, 7500, 7700), а в пяти лабораториях — термоциклер Light Cycler<sup>3</sup> (Roche) с учетом следующих изменений к протоколу, описанному в ISO 21570:2005,<sup>[41]</sup> С.2. Реакция ПСР проводилась в окончательном объеме 20 мкл, содержащем универсальную реакционную смесь для постановки ПСР QuantiTect Probe ПСР Master Mix<sup>3</sup> (Qiagen), праймеры GM1-F и GM1-R с концентрацией 500 нмоль/л каждого и зонд GM1 концентрацией 150 нмоль/л. Температурно-временная программа ПСР в реальном времени была следующей: начальная стадия 900 с при 95 °С, затем 45 циклов по 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С и 30 с при 72 °С. Сигнал флуоресценции был обнаружен на стадии элонгации. Была установлена скорость изменения температуры 2°С/с.

В качестве критерия пригодности метода был определен фактический предел детектирования,  $LOD_{prac}$ , для генетически модифицированной сои в соответствии с ISO 24276. Его значение было рассчитано отдельно для каждой пробы по Формуле (А.1):

$$LOD_{prac} \% = \frac{LOD_{abs}}{C_{s,DNA}} \cdot 100 \quad (A.1)$$

где

$LOD_{abs}$  значение LOD метода ПСР в реальном времени, специфичного для трансформационного события, используемого для количественного определения, в копиях на ПСР;

ПРИМЕЧАНИЕ Для расчетов в Таблице А.7 принято значение LOD равное 10 копиям.

$C_{s, ДНК}$  количество амплифицируемой соевой ДНК в пробе, определенное методом ПСР в реальном времени, специфичным для референсного гена сои, в копиях на ПСР.

1) Это пример доступного на рынке подходящего продукта. Приведенная информация дана для удобства пользователей этого международного стандарта и не является подтверждением ISO названного продукта. Можно использовать эквивалентные продукты, если было продемонстрировано, что их применение приводит к тем же самым результатам.



В Таблице А.7 приводятся результаты совместных испытаний. В четырех из пяти проб лецитина были получены средние значения  $LOD_{\text{prac}}$  ниже 0,9 % (пример существующей законодательной пороговой величины). Для пробы лецитина № 2 значение  $LOD_{\text{prac}}$  было выше 0,9 % только в одной лаборатории, для пробы лецитина № 3 — в двух лабораториях. Для пробы лецитина № 5 во всех лабораториях было амплифицировано менее 80 копий гена лецитина, поэтому не могло быть достигнуто значение  $LOD_{\text{prac}}$  0,9 % или ниже. Кроме того, были рассчитаны коэффициенты вариации воспроизводимости для зарегистрированного числа копий лецитина в пяти пробах лецитина. В общем, для оценки были использованы данные ПСР в реальном времени для 36 экстракций на пробу лецитина. При расчете коэффициента вариации воспроизводимости,  $C_{V,R}$ , не было исключено ни одного выброса. Для пробы 5 нельзя привести показатели прецизионности из-за низкого количества копий лецитина, которое менее значения LOQ метода. Необходимо отметить, что показатели прецизионности отображает коэффициент вариации воспроизводимости числа копий, экстрагированных из проб лецитина в условиях воспроизводимости при совместных испытаниях.

Таблица А.7 — Данные валидации

Проба лецитина №	Среднее число копий	Коэффициент вариации воспроизводимости $C_{V,R}$ %	Средний практический предел детектирования, $LOD_{\text{prac}}$ %	Число лабораторий с $LOD_{\text{prac}} < 0,9$ %
1	17 044	67	0,06	12/12
2	3 630	63	0,28	11/12
3	2 318	57	0,43	10/12
4	8 325	52	0,12	12/12
5	<80	не определен	>10	0/12

#### А.5.2.4 Принцип и резюме

Вязкую пробу гомогенизируют после нагревания и экстрагируют гексаном после добавления буфера гуанидинтиоцианата. Интегрирующие сопутствующие вещества отделяют путем экстракции хлороформом, а присутствующая в растворе RNA подвергается деградации рибонуклеазой А. ДНК осаждают изопропанолом в присутствии гликогена, затем промывают этанолом и растворяют в воде. Для очистки ДНК выполняют дополнительную гель-фильтрацию (используя гель декстрана с поперечными шивками для ситовой эксклюзионной хроматографии).

#### А.5.2.5 Термины и определения

Применительно к данному подразделу используют термины и определения, приведенные в ISO 5725-1<sup>[43]</sup> и ISO 24276.

#### А.5.2.6 Тип и количество пробы

Гарантируют, что проба для испытания является представительной для лабораторной пробы. Необходимые количества и операции, которые необходимо учитывать, описаны в 5.1. Проба должна быть, насколько это возможно, гомогенной.

### A.5.2.7 Оценка неопределенности измерения

Неопределенность измерения данных, полученных при анализе лецитина методом ПСР в реальном времени при совместных испытаниях приводится в виде коэффициента вариации воспроизводимости. Результаты указаны в Таблице А.7.

### A.5.2.8 Интерференция

Степень очистки лецитина может оказывать влияние на способность к экстрагированию ДНК из проб лецитина вследствие деградации ДНК, которая происходит при этой обработке.

### A.5.2.9 Физические условия и условия окружающей среды

Не требуется специальных условий. Относительно подробностей — см. ISO 24276.

### A.5.2.10 Аппаратура

Используют обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

**A.5.2.10.1 Центрифуга Table-top** для центрифужных сосудов вместимостью 1,5 мл или 2 мл, при ускорении не менее  $12\,000 \times g$ .

**A.5.2.10.2 Центрифуга** для центрифужных пробирок вместимостью 50 мл при ускорении не менее  $4\,000 \times g$ .

**A.5.2.10.3 Полипропиленовые центрифужные сосуды** вместимостью 1,5 мл, 2,0 мл и 50 мл, для использования в центрифугах при ускорении  $12\,000 \times g$  и  $4\,000 \times g$ .

**A.5.2.10.4 Нагревательный блок с встряхивающим устройством.**<sup>2)</sup>

**A.5.2.10.5 Вакуумная сушилка**, необязательно.

**A.5.2.10.6 Универсальный смеситель**, например, Vortex.

**A.5.2.10.7 Термоциклер для проведения ПСР в реальном времени**, оборудованный источником энергии, пригодным для возбуждения флуоресцирующих молекул, и оптической системой детектирования, способной обнаруживать сигналы флуоресценции, образующиеся при проведении ПСР.

**A.5.2.10.8 Реакционные сосуды и крышки**, которые можно многократно нагревать до температуры  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  и охлаждать до температуры  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  без повреждения и на которые не влияет сигнал флуоресценции, образующийся при амплификации.

**A.5.2.10.9 УФ-спектрофотометр или флуорометр** для определения концентрации ДНК.

### A.5.2.11 Реактивы и материалы

Относительно качества используемых реактивов — см. ISO 24276.

#### A.5.2.11.1 Гуанидинтиоцианат.

2) Встряхивающее устройство Eppendorf Thermomixer – пример доступного на рынке подходящего продукта. Приведенная информация дана для удобства пользователей этого международного стандарта и не является подтверждением ISO названного продукта.