
**Горизонтальные методы
молекулярного анализа с применением
биомаркеров. Методы анализа для
обнаружения генетически
модифицированных организмов и
полученных из них продуктов.**

Часть 2.

**Метод PCR, специфичный для
определения генетической
конструкции в реальном времени, для
обнаружения события FP967 в льне и
продуктах из него**

*Horizontal methods for molecular biomarker analysis — Methods of
analysis for the detection of genetically modified organisms and derived
products —*

*Part 2: Construct-specific real-time PCR method for detection of event
FP967 in linseed and linseed products*

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



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 установку интегрированных шрифтов в 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/TS 21569-2:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/76a6c89e-3a60-4659-856b-80135de01db7/iso-ts-21569-2-2012>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2012

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

Содержание

Страница

Предисловие	iv
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки.....	1
3 Термины и определения.....	1
4 Принцип.....	1
5 Реактивы и материалы	2
5.1 Реактивы для проведения PCR.....	2
6 Аппаратура.....	3
6.1 Общие положения.....	3
6.2 Прибор для проведения PCR.....	3
7 Отбор проб.....	3
8 Методика	3
8.1 Приготовление пробы для анализа.....	3
8.2 Приготовление экстрактов DNA	3
8.3 Экстракция DNA	3
8.4 Порядок проведения PCR.....	4
8.5 Температурно-временная программа.....	4
9 Критерии приемки/отбраковки.....	5
9.1 Общие положения.....	5
9.2 Идентификация	5
10 Статус валидации и критерии обеспечения качества.....	5
10.1 Устойчивость метода	5
10.2 Межлабораторные испытания.....	5
10.3 Совместные испытания.....	6
10.4 Чувствительность	7
10.5 Специфичность.....	8
11 Протокол испытаний	8
Библиография.....	9

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. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, приведенными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Для опубликования их в качестве международного стандарта требуется одобрение не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

При других обстоятельствах, особенно при наличии настоятельной необходимости такого документа для рынка, технический комитет может решить опубликовать другие типы нормативных документов:

- общедоступные технические условия ISO (ISO/PAS), представляющие собой соглашение между техническими экспертами рабочей группы ISO, и публикуемые при условии получения одобрения более чем 50% голосов членов головного технического комитета, принимавших участие в голосовании;
- технические условия ISO (ISO/TS), представляющие собой соглашение между членами технического комитета и публикуемые при условии утверждения 2/3 голосов членов комитета, принимавших участие в голосовании.

Документы ISO/PAS или ISO/TS пересматриваются через три года с целью принятия решения либо о продлении их действия на следующие три года, либо о пересмотре и публикации в качестве международного стандарта, либо о прекращении действия. Если принимается решение о продлении действия ISO/PAS и ISO/TS, они должны быть пересмотрены через следующие три года, когда они должны быть либо преобразованы в международный стандарт, либо отменены.

Следует учитывать возможность того, что некоторые элементы настоящего документа могут быть предметом патентного права. ISO не несет ответственности за идентификацию любого из таких патентных прав.

Технические условия ISO/TS 21569-2 были разработаны Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 16, *Горизонтальные методы молекулярного анализа с применением биомаркеров*.

Технические условия ISO/TS 21569 состоят из следующих частей под общим наименованием *Горизонтальные методы молекулярного анализа с применением биомаркеров. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов*:

- *Часть 2. Метод PCR, специфичный для определения генетической конструкции в реальном времени, для обнаружения события FP967 в льне и продуктах из него*

Горизонтальные методы молекулярного анализа с применением биомаркеров. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов.

Часть 2.

Метод PCR, специфичный для определения генетической конструкции в реальном времени, для обнаружения события FP967 в льне и продуктах из него

1 Область применения

Настоящий метод описывает методику обнаружения последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты (DNA), присутствующей в генетически модифицированной линии льна (*Linum usitatissimum*) (событие FP967, также называемое "CDC Triffid"). С этой целью экстрагированную DNA используют в полимеразной цепной реакции (PCR) в реальном времени и генетическую модификацию (GM) специфически обнаруживают путем амплификации последовательности DNA, включающей 105 пар нуклеотидных оснований (bp), которая представляет собой транзицию между терминатором гена нопалинсинтазы (*Tnos*) из *Agrobacterium tumefaciens* и геном дигидрофолатредуктазы (*dhfrA1*) из интегрона *Escherichia coli* класса 1.

Описываемый метод применяется для анализа DNA, экстрагированной из пищевых продуктов. Данный метод также применим для анализа DNA, экстрагированной из других продуктов, таких как корма и семена. Для применения этого метода необходима экстракция адекватного количества амплифицируемой DNA из соответствующей матрицы, предназначенной для анализа.

2 Нормативные ссылки

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

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

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

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются термины и определения, приведенные в ISO 24276.

4 Принцип

DNA экстрагируют из анализируемой пробы, применяя соответствующий метод. Анализ DNA состоит из двух частей:

- a) Верификация количества, качества и способности к амплификации экстрагированной DNA, например, путем проведения специфичной для целевого таксона PCR в реальном времени с помощью праймеров, которые амплифицируют длинный фрагмент, включающий 68 пар нуклеотидных оснований, из специфичного для льна (*Linum usitatissimum*) гена, кодирующего стеароил-ацильный белок-носитель десатуразы 2 (SAD) (Ссылка [1]).
- b) Обнаружение генетической конструкции *Tnos-dfr* в PCR в реальном времени (Ссылка [1]).

5 Реактивы и материалы

Как правило, следует использовать реактивы признанного аналитического качества, пригодные для молекулярной биологии. Используемая вода должна быть бидистиллированной или сопоставимого качества. Растворы следует готовить растворением соответствующих реактивов в воде с последующим автоклавированием, если не определено иначе. При проведении всех операций, в которых используются перчатки, следует гарантировать, что они не посыпаны пудрой. Использование защищенных от аэрозолей наконечников для пипеток служит защитой от перекрестной контаминации.

5.1 Реактивы для проведения PCR

5.1.1 Термостабильная DNA-полимераза (для PCR с горячим стартом).

5.1.2 Буферный раствор для проведения PCR (содержит хлорид магния и дезоксирибонуклеозид-трифосфат dATP, dCTP, dGTP and dUTP).

Могут использоваться готовые к употреблению смеси реактивов или отдельные компоненты. Также могут применяться реактивы и полимеразы, которые дают равные или лучшие результаты.

5.1.3 Олигонуклеотиды (см. Таблицу 1).

ISO/TS 21569-2:2012
<https://standards.iteh.org/standards/ISO/TS-21569-2-2012> Таблица 1 — Олигонуклеотиды

Наименование	DNA-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при PCR
Конструкция <i>Tnos-dfr</i> как целевая последовательность (Ссылка [1]):		
NOST-Spec FW	5'-AgC gCg CAA ACT Agg ATA AA-3'	800 нмоль/л
NOST-Spec RV	5'-ACC TTC Cgg CTC gAT gTC TA-3'	800 нмоль/л
NOST-Spec Probe	5'-(FAM)-CgC gCg Cgg TgT CAT CTA Tg-(BHQ)-3' ^a	100 нмоль/л
^a FAM: 6-карбоксифлуоресцеин, BHQ: темновой гаситель.		

ПРИМЕЧАНИЕ Для зонда можно использовать репортерные красители и/или красители-гасители, если они приводят к аналогичным или лучшим результатам испытания.

5.1.4 Стандартный раствор DNA для калибровки

Стандартный раствор DNA известной концентрации (нг/мкл) используется для расчета числа копий целевой последовательности *Tnos-dfr*.

Если в качестве стандартной DNA используется геномная DNA льна, то количество эквивалентов гаплоидного генома на микролитр, n_{hgEq} , должно рассчитываться на основе молекулярной массы гаплоидного генома льна, которая составляет приблизительно 0,7 пг (Ссылка [2]), применяя Формулу (1):

$$n_{hgEq} = \frac{[DNA] \times 1000}{m_{hg}} \quad (1)$$

где

[DNA] концентрация DNA, в нанogramмах на микролитр;

m_{hg} масса гаплоидного генома, в пикограммах.

При проведении совместных межлабораторных испытаний в качестве стандартной DNA использовалась плазида, которая содержит копию фрагмента *Tnos-df*, включающего 105 пар нуклеотидных оснований, и большого фрагмента гена SAD, включающего 68 пар нуклеотидных оснований, соответственно. Поскольку точное количество интеграций конструкции *Tnos-dfr* в событии FP967 в льне было неизвестно во время разработки этого документа, рассчитанное GM-содержание (содержание ГМО) представляет собой только оценку, которая основывается на предположении о том, что целевая последовательность присутствует в виде единственной копии на гаплоидный геном.

6 Аппаратура

6.1 Общие положения

Относительно аппаратуры и материалов см. ISO 21569. В дополнение к обычной лабораторной аппаратуре необходимо следующее оборудование.

6.2 Прибор для проведения PCR

Прибор для проведения PCR в реальном времени, пригодный для возбуждения флуоресцирующих молекул и обнаружения сигналов флуоресценции, генерируемых во время проведения PCR.

7 Отбор проб

Все пробы должны быть однозначно идентифицированы.

8 Методика

8.1 Приготовление пробы для анализа

Следует убедиться в том, что проба для анализа, используемая для экстракции DNA, является репрезентативной для лабораторной пробы, например, путем измельчения или гомогенизации проб. Принимают во внимание критерии и последовательность операций, установленные в ISO 21571 и ISO 24276.

8.2 Приготовление экстрактов DNA

Относительно приготовления экстрактов DNA из пробы для анализа, необходимо следовать общим инструкциям и критериям, описанным в ISO 21571. Рекомендуется выбрать один из методов экстракции DNA, описанных в ISO 21571:2005, Приложение А.

8.3 Экстракция DNA

Рекомендуется выполнять экстракцию DNA с применением метода СТАВ, используя пробу для анализа, масса которой равняется 1 г гомогенизированной пробы (см. ISO 21571:2005, А.3.1).

Из-за проблем, связанных с чистотой может потребоваться дополнительная стадия очистки (гель-фильтрация, например, с применением колонок Micro-spin).

До тех пор, пока обеспечивается сравнимость результатов, могут применяться другие методы экстракции и очистки (например, системы наборов) с использованием меньших проб для анализа, если необходимо (Ссылка [1]).

8.4 Порядок проведения PCR

Описанный метод применим для суммарного объема 25 мкл на PCR. Следует использовать реактивы, приведенные в Таблице 2.

Реактивы следует подвергнуть полному оттаиванию при комнатной температуре и недолговременному центрифугированию перед использованием. Каждый реактив следует тщательно перемешать перед отмериванием пипеткой. Готовят реакционную смесь, которая содержит все компоненты, кроме пробы DNA. Требуемое количество реакционной смеси для проведения PCR зависит от количества выполняемых реакций, включая по меньшей мере одну дополнительную реакцию в качестве резерва, необходимого для возмещения потерь при отмеривании реактивов пипеткой. Используют объем, равный 5 мкл пробы DNA.

Таблица 2 — Добавление реактивов

Суммарный реакционный объем	25 мкл
Проба DNA (до 200 нг) или контроли	5 мкл
Буферный раствор ^a для проведения PCR (содержащий MgCl ₂ , dNTPs и DNA-полимеразу для PCR с горячим стартом)	12,5 мкл
Праймер	см. Таблицу 1
Зонд	см. Таблицу 1
Вода	добавляют для получения 25 мкл
^a При проведении совместных межлаборатных испытаний в качестве буферного раствора для проведения PCR была использована готовая реакционная смесь TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems). Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не означает поддержки этого продукта со стороны ISO. Могут использоваться эквивалентные продукты от других изготовителей при условии, что они показывают эквивалентный или лучший результат. При необходимости адаптируют количества реактивов и температурно-временную программу.	

80135de01db7/iso-ts-21569-2-2012

Перемешивают реакционную смесь, недолговременно центрифугируют и отмеряют пипеткой по 20 мкл в каждую реакционную пробирку. Для контроля реагентов PCR добавляют 5 мкл воды в соответствующую пробирку для проведения реакции. Отмеряют пипеткой либо 5 мкл пробы DNA, либо 5 мкл раствора соответствующего контроля (пустой контроль экстракции, положительный контроль целевой DNA). При необходимости готовят контроль ингибирования PCR, как описано в ISO 24276.

Переносят пробирки для проведения реакции в термоциклер и включают температурно-временную программу.

8.5 Температурно-временная программа

При анализе валидации была использована температурно-временная программа, указанная в Таблице 3. Она применялась вместе с готовой реакционной смесью TaqMan Universal Mastermix. При использовании различных условий реакции и разных циклеров для проведения PCR в реальном времени может потребоваться специальная оптимизация. Время начальной денатурации зависит от используемой реакционной смеси.

Таблица 3 — Температурно-временная программа

Стадия	Параметр	Температура	Время	Измерение флуоресценции	Циклы	
1	Начальная денатурация	95 °C	10 мин	нет	1	
2	Аmplификация	Денатурация	95 °C	15 с	нет	45
		Отжиг и элонгация	60 °C	60 с	да	

9 Критерии приемки/отбраковки

9.1 Общие положения

Для идентификации продуктов реакции PCR используется соответствующая программа анализа данных, зависящих от прибора для проведения PCR в реальном времени. Результаты амплификации могут быть представлены разными способами в зависимости от используемого прибора. При отсутствии обнаруживаемых продуктов PCR (отрицательный результат) в протоколе испытания указывают, например, "не определено", "нет амплификации" или максимальное количество возможных циклов. При обнаружении в пробе амплификации целевой последовательности DNA (положительный результат) можно наблюдать сигмоидальную кривую амплификации и тогда рассчитывают количество циклов, при котором было превышено заданное пороговое значение флуоресценции (значение C_t или значение C_p).

Если автоматическая интерпретация не дает достоверного результата из-за нетипичных данных измерения флуоресценции, может потребоваться ручная установка базовой линии и порогового значения перед интерпретацией данных. В этом случае следует применять инструкции для конкретного прибора, приведенные в руководстве по использованию программного обеспечения для интерпретации данных.

9.2 Идентификация

Целевая последовательность считается обнаруженной, если

- при использовании специфичных для конструкции *Tnos-dfr* праймеров NOST-Сpec FW и NOST-Сpec RV, а также зонда NOST-Сpec-Probe можно наблюдать сигмоидальную кривую амплификации и было превышено заданное пороговое значение флуоресценции,
- при использовании специфичной для льна PCR в реальном времени (Ссылка [1]) можно наблюдать сигмоидальную кривую амплификации и было превышено заданное пороговое значение флуоресценции,
- при проведении контролей PCR без добавления DNA (контроль реагентов PCR, отрицательный контроль экстракции) нельзя наблюдать сигмоидальную кривую амплификации и не было превышено заданное пороговое значение флуоресценции и
- при проведении контролей амплификации (положительный контроль целевой DNA, контроль ингибирования PCR) достигнуты ожидаемые значения C_t (или значения C_p).

10 Статус валидации и критерии обеспечения качества

10.1 Устойчивость метода

Проверка устойчивости метода относительно небольших изменений показателей, таких как концентрации реактивов (например, праймеров, зонда) или условия реакции (например, температура отжига) не проводилась.

ПРИМЕЧАНИЕ При выполнении совместных межлабораторных испытаний было проверена устойчивость метода относительно различных приборов для проведения PCR в реальном времени (ABI 7500, ABI 7700, ABI 7900, RotorGene 3000, RotorGene 6000, LightCycler 480).¹⁾ Прибор для проведения PCR в реальном времени не оказывал влияния на характеристики метода.

10.2 Межлабораторные испытания

В Лаборатории Европейского союза по определению генетически модифицированных пищевых продуктов и кормов (EURL-GMFF) были проведены эксперименты с DNA, экстрагированной из семян FP967, для верификации специфичности и чувствительности метода, специфичного для определения генетической конструкции (Ссылка [1]). Экспериментальная проверка специфичности показала, что при

1) Примеры доступных на рынке подходящих продуктов. Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не означает поддержки этого продукта со стороны ISO.

анализе PCR, специфичной для конструкции *Tnos-dfr*, не обнаружено других генетически модифицированных событий в испытуемых условиях. Предел детектирования метода, установленный в 60 реплик PCR каждая в 50, 25, 10, 5, 1 и 0,1 копии целевой последовательности (теоретически рассчитанный), показал 60 положительных реакций с 5 копиями и 58 положительных реакций с 1 копией.

10.3 Совместные испытания

Метод был валидирован в ходе совместных испытаний (Ссылка [3]), скоординированных Немецким федеральным управлением по защите потребителей и безопасности пищевых продуктов (BVL), в соответствии с протоколом IUPAC (Ссылка [4]). В этих испытаниях было задействовано всего 11 участников. Участники получили по 14 проб DNA для анализа. Пробы содержали различные концентрации целевой последовательности *Tnos-dfr*. Все пробы были промаркированы случайными кодовыми номерами.

Для приготовления проб геномная DNA экстрагировалась из генетически модифицированного (GM) льна (событие FP967) (стандартный образец CDC-FL001-2 из Калифорнийского университета, Riverside/USA¹), из GM-positive продукта из льна (рыночные образцы из CVUA, Freiburg¹), а также из не модифицированных генетически (non-GM) семян рапса (семян озимого рапса, KWS¹), non-GM льняных семян (LGL, Oberschleißheim¹) или non-GM картофельного крахмала (ERM-BF421a из IRMM, Geel¹) и использовалась в качестве исходных растворов DNA. Концентрации DNA определялись с помощью спектрофотометрии. Число копий было рассчитано на основе размеров генома, предполагая интеграцию одной копии целевой последовательности на гаплоидный геном. Концентрацию DNA (в пг/мкл) делили на опубликованное среднее значение 1C для льна (0,7 пг, Ссылка [2]), рапса (1,23 пг, Ссылка [5]) и картофеля (1,8 пг, Ссылка [5]), соответственно. Концентрация DNA из Non-GM семян рапса была приведена к уровню приблизительно $4,8 \times 10^4$ копий на 5 мкл; концентрации DNA из non-GM картофеля и DNA из льна были приведены к уровню приблизительно $5,0 \times 10^4$ геномных копий на 5 мкл. В конце концов различные растворы DNA были разделены на 14 закодированных проб DNA («слепых» дубликатов) для каждого участника совместных испытаний. Каждый участник получил по 2 пробирки («слепые» дубликаты), содержащие следующие растворы DNA:

- 100 % FP967 DNA (приведенный к расчетной концентрации 10 копий на 5 мкл раствора DNA)
- 100 % FP967 DNA (приведенный к расчетной концентрации 50 копий на 5 мкл раствора DNA)
- DNA из GM-positive льна из рыночных образцов (приведенный к $C_t = 30$ на 5 мкл раствора DNA)
- пробы из GM-positive льна из рыночных образцов (приведенный до $C_t = 32$ на 5 мкл раствора DNA)
- DNA из non-GM семян рапса (приведенный к расчетной концентрации 48 660 копий на 5 мкл раствора DNA)
- DNA из non-GM картофеля (приведенный к расчетной концентрации 50 000 копий на 5 мкл раствора DNA)
- DNA из non-GM льна (приведенный к расчетной концентрации 50 000 копий на 5 мкл раствора DNA)

Кроме того, все участники получили раствор DNA с плазмидой DNA (FP967/CDC Triffid plasmid (Genetic ID AG, Augsburg, Germany¹)) для расчета числа копий конструкции *Tnos-dfr* в пробах (начальная расчетная концентрация плазмиды DNA 500 копий на мкл после восстановления влагосодержания лиофилизата в 100 мкл воды, не содержащей нуклеазы). На основе этого стандартного раствора DNA участниками была приготовлена серия разбавлений $0,2 \times TE$, чтобы получить растворы DNA для 5 калибровочных точек (2 500, 500, 150, 50 и 10 копий целевой последовательности), а также раствор DNA, содержащий 5 копий, используемый в качестве контроля чувствительности. Каждая проба была проанализирована участниками путем единичного определения на 5 мкл растворов DNA по методу PCR в реальном времени для обнаружения генетической конструкции *Tnos-dfr* в условиях, описанных в Таблицах 1 – 3. Растворы DNA для калибровки, а также раствор плазмиды DNA, содержащий 5 копий, были измерены в двух репликах PCR. Измерение выполнялось с использованием различных приборов для проведения PCR в реальном времени (см. 10.1). Результаты совместных испытаний представлены в Таблице 4 и Таблице 5.