
**Méthodes horizontales d'analyse
moléculaire de biomarqueurs —
Méthodes d'analyse pour la détection
des organismes génétiquement
modifiés et des produits dérivés —**

Partie 3:

**Méthode PCR en temps réel construit-
spécifique pour la détection de la
séquence P35S-pat pour criblage des
organismes génétiquement modifiés**

<https://standards.iteh.ai/standards/iso-ts-21569-3-2015/1c4f6a59b17d/iso-ts-21569-3-2015>

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

*Part 3: Construct-specific real-time PCR method for detection of P35S-
pat-sequence for screening genetically modified organisms*



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 21569-3:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53f024ae-0418-4414-868d-1c4f6a59b17d/iso-ts-21569-3-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53f024ae-0418-4414-868d-1c4f6a59b17d/iso-ts-21569-3-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015

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

Sommaire

Page

| | |
|---|-----------|
| Avant-propos..... | iv |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 1 |
| 4 Principe | 2 |
| 5 Réactifs et matériaux | 2 |
| 5.1 Généralités..... | 2 |
| 5.2 Réactifs PCR..... | 2 |
| 6 Appareillage | 3 |
| 7 Mode opératoire | 3 |
| 7.1 Préparation de l'échantillon pour essai..... | 3 |
| 7.2 Préparation des extraits d'ADN..... | 3 |
| 7.3 Réaction PCR..... | 3 |
| 7.4 Programme d'amplification..... | 4 |
| 8 Critères d'acceptation/rejet | 4 |
| 8.1 Généralités..... | 4 |
| 8.2 Identification..... | 5 |
| 8.3 Calcul du nombre de copies pour la séquence P35S-pat | 5 |
| 9 État de validation et critères de performance | 5 |
| 9.1 Robustesse de la méthode..... | 5 |
| 9.2 Essai interlaboratoires pour la détermination de la limite de détection (LOD)..... | 5 |
| 9.3 Essai interlaboratoires pour la quantification du construit P35S-pat dans le colza..... | 6 |
| 9.4 Sensibilité..... | 8 |
| 9.5 Spécificité..... | 8 |
| 10 Rapport d'essai | 9 |
| Bibliographie | 10 |

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/531024ae-0416-4414-808d-1c4f6a59b17d/iso-ts-21569-3-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

L'ISO 21569 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général, *Méthodes horizontales d'analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés*:

- *Partie 2: Méthode PCR en temps réel spécifique de la construction pour la détection d'un événement FP967 dans les graines de lin et les produits à base de graines de lin* [Spécification technique]
- *Partie 3: Méthode PCR en temps réel construit-spécifique pour la détection de la séquence P35S-pat pour criblage des organismes génétiquement modifiés* [Spécification technique]

L'ISO 21569:2005 est destinée à être révisée pour devenir la future Partie 1.

Méthodes horizontales d'analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés —

Partie 3:

Méthode PCR en temps réel construit-spécifique pour la détection de la séquence P35S-pat pour criblage des organismes génétiquement modifiés

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique décrit un mode opératoire permettant la détection d'une séquence d'ADN de transition entre le promoteur 35S (*P35S*) du *virus de la mosaïque du chou-fleur* et un gène modifié codant pour l'enzyme phosphinothricine-acétyltransférase (*pat*) et provenant de *Streptomyces viridochromogenes*. Le construit *P35S-pat* est fréquemment observé dans les plantes génétiquement modifiées présentant une tolérance aux herbicides contenant de la phosphinothricine. La méthode spécifique du construit *P35S-pat* est basée sur une méthode par PCR en temps réel et peut être utilisée à des fins de criblage qualitatif et quantitatif. Pour l'identification et la quantification d'un événement spécifique, une analyse complémentaire doit être effectuée.

La présente Spécification technique est applicable à l'analyse de l'ADN extrait de produits alimentaires. Elle peut être également utilisée pour analyser l'ADN extrait d'autres produits tels que des aliments pour animaux et des semences. L'application de cette méthode exige qu'une quantité adéquate d'ADN amplifiable de qualité appropriée soit extraite de la matrice étudiée.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 21569, *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*

ISO 21571, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 24276 s'appliquent.

4 Principe

L'ADN est extrait de la prise d'essai en appliquant une méthode appropriée. L'analyse de l'ADN comprend deux parties, à savoir:

- 1) vérification de la quantité et de l'amplificabilité de l'ADN extrait, par exemple au moyen d'une PCR en temps réel spécifique pour le taxon cible (voir l'ISO 21570[10]) et
- 2) détection du construit *P35S-pat* par une PCR en temps réel.[1,2]

5 Réactifs et matériaux

5.1 Généralités

En règle générale, des substances chimiques de qualité analytique reconnue, appropriées pour la biologie moléculaire, doivent être utilisées. L'eau utilisée doit être bidistillée ou de qualité PCR (c'est-à-dire exempte de nucléases et d'acides nucléiques). Pour toutes les opérations nécessitant le port de gants, il convient de s'assurer que ceux-ci ne sont pas poudrés. Pour éviter toute contamination croisée, il est recommandé d'utiliser des embouts de pipette protégés contre les aérosols.

5.2 Réactifs PCR

5.2.1 ADN polymérase thermostable, pour PCR à démarrage à chaud (hot start PCR).

5.2.2 Solution tampon pour PCR, contenant du chlorure de magnésium et les désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dUTP).

Il est possible d'utiliser des mélanges de réactifs ou des préparations de composants individuels prêts à l'emploi. Des réactifs et des polymérases conduisant à des résultats équivalents ou meilleurs peuvent également être utilisés.

5.2.3 Oligonucléotides (voir [Tableau 1](#)).

Tableau 1 — Oligonucléotides

| Nom | Séquence d'ADN de l'oligonucléotide | Concentration finale dans la PCR |
|---|---|----------------------------------|
| Construit <i>P35S-pat</i> comme séquence cible:[1],[2] | | |
| Amorce 35SP03.f | 5'-AAG TTC ATT TCA TTT ggA gAg gAC A-3' | 200 nmol/l |
| Amorce pat-7.r | 5'-Cgg CCA TAT CAg CTg CTg TA-3' | 200 nmol/l |
| Sonde GSS01.s | 5'-(FAM)-CCg gAg Agg AgA CCA gTT gAg ATT Agg C-(TAMRA)-3'a | 100 nmol/l |
| ^a FAM: carboxy-6-fluorescéine, TAMRA: carboxy-6-tétraméthylrhodamine | | |

NOTE Des colorants rapporteurs et/ou des colorants extincteurs équivalents peuvent être utilisés pour la sonde s'il peut être démontré qu'ils donnent des résultats similaires ou meilleurs.

5.2.4 ADN étalon pour l'étalonnage

Une solution d'ADN étalon ayant une concentration connue (ng/μl) peut être utilisée pour calculer le nombre de copies de la séquence cible *P35S-pat*.

Lorsque l'ADN génomique d'une plante est utilisé comme ADN étalon, il convient de calculer le nombre d'équivalents génome haploïde sur la base de la masse moléculaire du génome haploïde de la plante, en appliquant la Formule (1):

$$\text{Nombre d'équivalents génome par } \mu\text{l} = \frac{\text{concentration d'ADN [ng/}\mu\text{l]} \cdot 1\,000}{\text{masse du génome haploïde [pg]}} \quad (1)$$

Sur la base des équivalents génome, il est possible de calculer le nombre de copies correspondant pour la séquence *P35S-pat*. Pour ce faire, le nombre d'intégrations dans le génome de la plante ainsi que le degré de zygoté de la plante utilisée doivent être pris en compte.

6 Appareillage

L'appareillage et les matériaux sont spécifiés dans l'ISO 21569. Outre le matériel courant de laboratoire, les équipements suivants sont requis:

6.1 Appareil de PCR en temps réel, approprié pour l'excitation des molécules fluorescentes et pour la détection des signaux de fluorescence générés pendant la PCR.

7 Mode opératoire

7.1 Préparation de l'échantillon pour essai

Il convient de s'assurer que l'échantillon pour essai utilisé pour l'extraction de l'ADN est représentatif de l'échantillon pour laboratoire, par exemple en broyant ou homogénéisant les échantillons. Les mesures et étapes opératoires à prendre en considération doivent être telles que décrites dans l'ISO 21571 et l'ISO 24276.

[ISO/TS 21569-3:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53f024ae-0418-4414-868d-17d/iso-ts-21569-3-2015)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53f024ae-0418-4414-868d-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53f024ae-0418-4414-868d-17d/iso-ts-21569-3-2015)

7.2 Préparation des extraits d'ADN

Concernant la préparation d'ADN à partir de la prise d'essai, il convient de suivre les instructions générales et les mesures spécifiées dans l'ISO 21571. Il est recommandé de choisir l'une des méthodes d'extraction d'ADN décrites dans l'ISO 21571, Annexe A.

7.3 Réaction PCR

La méthode est décrite pour un volume total de 25 μl par réaction PCR. Le mélange réactionnel est indiqué dans le [Tableau 2](#).

Décongeler totalement les réactifs à température ambiante. Il convient de s'assurer que chaque réactif est soigneusement mélangé et brièvement centrifugé juste avant d'être pipeté. Préparer un mélange de réactifs pour PCR contenant tous les composants, sauf l'ADN échantillon. La quantité nécessaire de mélange de réactifs pour PCR dépend du nombre de réactions à réaliser, en incluant au moins une réaction supplémentaire comme réserve de pipetage. Ajouter 5 μl d'ADN échantillon à chaque réaction.

Tableau 2 — Mélange réactionnel pour l'amplification

| | |
|---|--------------------------------|
| Volume réactionnel total | 25 µl |
| ADN échantillon (jusqu'à 200 ng) ou témoins | 5 µl |
| Solution tampon pour PCR ^a (contenant du MgCl ₂ , des dNTP et de l'ADN polymérase à «démarrage à chaud») | 12,5 µl |
| Amorce 35SP03.f et pat-7.r | voir Tableau 1 |
| Sonde GSS01.s | voir Tableau 1 |
| Eau | Complément à 25 µl |
| ^a Lors de l'essai interlaboratoires, en fonction des appareils de PCR en temps réel utilisés, différentes solutions tampons PCR ont été utilisées [TaqMan Universal PCR Mastermix (Life Technologies, Darmstadt), QuantiTect Multiplex PCR NoROX ou QuantiTect Probe PCR Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden)]. Ces informations sont données pour le confort de l'utilisateur du présent document, mais ne constituent aucunement une approbation de la part de l'ISO. Des produits équivalents commercialisés par d'autres fabricants peuvent être utilisés s'ils donnent des résultats similaires ou meilleurs. Si nécessaire, adapter les quantités de réactifs ainsi que le programme d'amplification. | |

Agiter le mélange de réactifs pour PCR, le centrifuger brièvement et introduire à l'aide d'une pipette 20 µl dans chaque tube de réaction. Pour le témoin de réactif pour amplification, ajouter 5 µl d'eau au mélange réactionnel correspondant. À l'aide d'une pipette, ajouter 5 µl d'ADN échantillon ou 5 µl de la solution témoin correspondante (témoin de blanc d'extraction, témoin positif d'ADN cible). Si nécessaire, préparer un témoin d'inhibition de PCR tel que décrit dans l'ISO 24276.

Transférer les mélanges réactionnels dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification.

7.4 Programme d'amplification

Le programme d'amplification indiqué dans le [Tableau 3](#) a été utilisé pour l'étude de validation. L'utilisation de diverses conditions de réaction et de divers cycleurs pour PCR en temps réel peut nécessiter une optimisation spécifique. Le temps nécessaire pour la dénaturation initiale dépend du mélange maître utilisé.

Tableau 3 — Programme d'amplification

| Étape | Paramètre | Température | Durée | Mesurage de la fluorescence | Cycles |
|-------|----------------------------------|-------------|--------|-----------------------------|--------|
| 1 | Activation de l'UNG (facultatif) | 50 °C | 2 min | non | 1 |
| 2 | Dénaturation initiale | 95 °C | 10 min | non | 1 |
| 3 | Dénaturation | 95 °C | 15 s | non | 45 |
| | Hybridation et élongation | 60 °C | 60 s | oui | |

8 Critères d'acceptation/rejet

8.1 Généralités

Un programme d'analyse des données spécifique à l'appareil de PCR en temps réel correspondant est utilisé pour l'identification des produits de PCR. Les résultats de l'amplification peuvent être exprimés d'une manière différente, selon l'appareil utilisé. En l'absence de produits de PCR détectables (résultat négatif), le résultat peut être exprimé comme suit: «indéterminé», «pas d'amp.» ou nombre maximal de cycles possibles. Si l'amplification de la séquence cible d'ADN se produit dans un échantillon (par exemple, témoin positif), on peut observer une courbe d'amplification de forme sigmoïde et calculer le nombre de cycles auquel une valeur seuil de fluorescence prédéterminée est dépassée (valeur C_t ou valeur C_p).

Si, en raison de données de fluorescence mesurée atypiques, l'interprétation automatique ne fournit pas un résultat probant, il peut être nécessaire de fixer manuellement la ligne de base et le seuil avant l'interprétation des données. Dans ce cas, il est nécessaire de suivre les instructions spécifiques à l'appareil données dans le manuel concernant l'utilisation du logiciel d'interprétation.

8.2 Identification

La séquence cible est considérée comme détectée si:

- en utilisant les amorces 35SP03.f et pat-7.r spécifiques au construit *P35S-pat* et la sonde GSS01.s, une courbe d'amplification de forme sigmoïde peut être observée et une valeur seuil de fluorescence prédéterminée est dépassée;
- dans les réactions PCR témoins sans ADN ajouté (témoin de réactif pour PCR, témoin négatif d'extraction), aucune courbe d'amplification de forme sigmoïde ne peut être observée et une valeur seuil de fluorescence prédéterminée n'est pas dépassée; et
- dans les réactions pour le témoin d'amplification (témoin positif d'ADN cible, témoin d'inhibition de PCR), les valeurs C_t (ou les valeurs C_p) attendues sont obtenues.

8.3 Calcul du nombre de copies pour la séquence *P35S-pat*

Avec les ADN étalons contenant des quantités définies de nombres de copies pour la séquence *P35S-pat* (voir 5.2.4, 9.3), une courbe d'étalonnage peut être établie et utilisée pour calculer les nombres de copies pour la séquence *P35S-pat* dans des échantillons inconnus.

9 État de validation et critères de performance

9.1 Robustesse de la méthode

La robustesse de la méthode n'a pas été évaluée par rapport à de faibles modifications de facteurs tels que les concentrations de réactifs (par exemple, amorces, sonde) ou les conditions de réaction (par exemple, températures d'hybridation).

NOTE Lors de l'essai interlaboratoires, la robustesse de la méthode a été vérifiée par rapport à différents appareils de PCR en temps réel et à différentes solutions tampons pour PCR. Les appareils de PCR en temps réel et les solutions tampons pour PCR n'ont eu aucune influence sur les performances de la méthode.

9.2 Essai interlaboratoires pour la détermination de la limite de détection (LOD)

La LOD de la méthode a été évaluée dans le cadre d'un essai interlaboratoires coordonné, en 2011, par le Bureau fédéral allemand de la protection des consommateurs et de la sécurité alimentaire (BVL), avec un total de 10 participants. Les participants ont reçu quatre échantillons d'ADN provenant de végétaux modifiées génétiquement contenant la séquence cible *P35S-pat*.

Pour préparer les échantillons, on a utilisé des matériaux de référence certifiés fournis par l'American Oil Chemists' Society (AOCS, Urbana, États-Unis), ainsi que par l'Institut de Matériaux de Référence et de Mesures (IRMM) à Geel, Belgique. Les matériaux utilisés étaient de l'ADN provenant de feuilles de canola T45 (AOCS, 0208-A2), de soja A2704-12 (AOCS, 0707-B2), de maïs T25 (AOCS, 0306-H), et d'ADN extrait de poudre de semences de maïs 1507 (IRMM, ERM-BF418d). Les concentrations en ADN ont été déterminées par photospectrométrie. Les nombres d'équivalents génome par microlitre (μ l) ont été calculés en appliquant la Formule (1). Sur la base du nombre d'équivalents génome, le nombre de copies correspondant pour la séquence *P35S-pat* a été calculé en tenant compte du nombre d'intégrations de la séquence *P35S-pat* dans le génome de la plante ainsi que du degré de zygoté de la plante utilisée (voir Tableau 4). Les nombres de copies des ADN échantillons ont été ajustés à environ 100 copies de la séquence *P35S-pat* par microlitre (μ l).