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

Partie 4:

**Méthodes de criblage par PCR en
temps réel pour la détection des
séquences ADN *P-nos* et *P-nos-nptII***

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec119d0-8d9c-4612-9ab6-1394b21569-4/2016>

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

Part 4: Real-time PCR based screening methods for the detection of the P-nos and P-nos-nptII DNA sequences

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 21569-4:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec119d0-8d9c-4612-9ab6-a14155c8c081/iso-ts-21569-4-2016>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2016, Publié en Suisse

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
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| Avant-propos | iv |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 2 |
| 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 |
| 9 État de validation et critères de performance | 5 |
| 9.1 Généralités..... | 5 |
| 9.2 Robustesse de la méthode..... | 5 |
| 9.3 Essai interlaboratoires..... | 5 |
| 9.4 Sensibilité..... | 7 |
| 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.

(standards.iteh.ai)

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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html

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*.

Une liste de toutes les parties de l'ISO/TS 21569 est disponible sur le site de l'ISO.

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

Partie 4: Méthodes de criblage par PCR en temps réel pour la détection des séquences ADN *P-nos* et *P-nos-nptII*

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie un mode opératoire permettant la détection d'une séquence d'ADN de la région du promoteur du gène codant la nopaline synthase (*P-nos*) d'*Agrobacterium tumefaciens* et un mode opératoire permettant la détection de la séquence d'ADN de transition entre le *P-nos* et le gène de la néomycine phosphotransférase (*nptII*) du transposon Tn5 d'*Escherichia coli* K12. Le promoteur *nos* et le construit *P-nos-nptII* sont fréquemment observés dans les plantes génétiquement modifiées. Les méthodes spécifiques de *P-nos* et *P-nos-nptII* sont basées sur une méthode par PCR en temps réel et peuvent être utilisées à des fins de criblage qualitatif. Pour l'identification et la quantification d'une plante génétiquement modifiée (événement) spécifique, une analyse complémentaire doit être effectuée.

Les méthodes décrites sont applicables à l'analyse de l'ADN extrait de produits alimentaires. Elles peuvent être également utilisées pour analyser l'ADN extrait d'autres produits tels que des aliments pour animaux et des semences. L'application de ces méthodes exige qu'une quantité adéquate d'ADN amplifiable soit extraite de la matrice étudiée.

La séquence d'ADN amplifiée par la méthode spécifique à l'élément *P-nos* peut être détectée dans des échantillons contenant l'ADN du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* présent dans la nature. Pour cette raison, il est nécessaire de confirmer un résultat positif de criblage. D'autres analyses sont nécessaires au moyen de méthodes spécifiques aux construits ou spécifiques aux événements.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 21570, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*

ISO 21571:2005, *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 16577 s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

4 Principe

L'ADN est extrait de l'échantillon pour essai en appliquant une méthode appropriée (voir l'ISO 21571). L'analyse de l'ADN comprend deux parties:

- a) 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 (conformément à l'ISO 21570), voir également la Référence [1];
- b) détection des séquences *P-nos* et/ou *P-nos-nptII* par une PCR en temps réel, voir les Références [2],[3] et [4].

5 Réactifs et matériaux

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.1 Généralités

Pour les besoins du présent document, seules des substances chimiques et de l'eau de qualité analytique reconnue, appropriées pour la biologie moléculaire, doivent être utilisées. Sauf indication contraire, il convient de préparer les solutions par dissolution des réactifs correspondants dans l'eau et par traitement à l'autoclave. 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»).

5.2.2 Solution tampon pour PCR (contenant du chlorure de magnésium et des désoxyribonucléosides triphosphates, dNTP).

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 être également utilisés.

5.2.3 Oligonucléotides (voir [Tableaux 1](#) et [2](#)).

Tableau 1 — Oligonucléotides pour la détection de l'élément *P-nos*

| Nom | Séquence d'ADN de l'oligonucléotide | Concentration finale dans la PCR |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>P-nos</i> comme séquence cible ^[4] : | | |
| Amorce p-nos-F1 | 5'-AAg CAC ATA CgT CAg AAA CCA TTA TT-3' | 400 nmol/l |
| Amorce p-nos-R | 5'-TCA gTg gAg CAT TTT TgA CAA gAA-3' | 400 nmol/l |
| Sonde p-nos-Tm | 5'-(FAM)-CgC gTT CAA AAg TCg CCT AAg gTC AC-(BBQ)-3' ^a | 100 nmol/l |
| <p>^a FAM: carboxy-6-fluorescéine, BBQ: Extincteur BlackBerry®. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents commercialisés par d'autres fabricants peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils donnent des résultats similaires ou meilleurs.</p> | | |

Tableau 2 — Oligonucléotides pour la détection du construit *P-nos-nptII*

| Nom | Séquence d'ADN de l'oligonucléotide | Concentration finale dans la PCR |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>P-nos-nptII</i> comme séquence cible ^[4] : | | |
| Amorce p-nos-F2 | 5'-TTC CCC TCg gTA TCC AAT TAg Ag-3' | 400 nmol/l |
| Amorce NPTII-R | 5'-gAT TgT CTg TTg TgC CCA gTC A-3' | 400 nmol/l |
| Sonde NPTII-Tm2 | 5'-(FAM)-AgC CgA ATA gCC TCT CCA CCC AAg C-(BBQ)-3' ^a | 100 nmol/l |
| <p>^a FAM: carboxy-6-fluorescéine, BBQ: Extincteur BlackBerry®. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents commercialisés par d'autres fabricants peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils donnent des résultats similaires ou meilleurs.</p> | | |

(standards.iteh.ai)

6 Appareillage

ISO/TS 21569-4:2016

Les exigences concernant l'appareillage et les matériaux doivent être conformes à l'ISO 21569. Outre le matériel courant de laboratoire, l'équipement suivant est 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 soit représentatif de l'échantillon pour laboratoire, par exemple en broyant ou homogénéisant les échantillons. Les mesures et étapes opératoires à prendre en considération sont décrites dans l'ISO 21571 et l'ISO 24276.

7.2 Préparation des extraits d'ADN

Concernant la préparation d'ADN de l'échantillon pour 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 21571:2005, 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 3](#).

Les réactifs sont totalement décongelés à température ambiante. Il convient de s'assurer que chaque réactif est soigneusement mélangé et brièvement centrifugé juste avant d'être pipeté. Un mélange de

réactifs pour PCR, contenant tous les composants, sauf l'ADN échantillon, est préparé. 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.

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.

Tableau 3 — Composants du mélange réactionnel pour PCR

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 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 |
| Amorces | voir Tableau 1 ou 2 |
| Sonde | voir Tableau 1 ou 2 |
| Eau | ajouter pour obtenir 25 µl |
| ^a Dans le cadre de l'essai interlaboratoires, le mélange maître TaqMan® Universal (Life Technologies) a été utilisé comme solution tampon PCR. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents commercialisés par d'autres fabricants peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils donnent des résultats similaires ou meilleurs. Si nécessaire, adapter les quantités de réactifs ainsi que le programme d'amplification. | |

ISO/TS 21569-4:2016

7.4 Programme d'amplification

<http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec119d0-8d9c-4612-9ab6-a14155c8c081/iso-ts-21569-4-2016>

Le programme d'amplification indiqué dans le [Tableau 4](#) 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 4 — Programme d'amplification

| Étape | Paramètre | Température | Durée | Mesurage de la fluorescence | Cycles | |
|-------|-----------------------|---------------------------|--------|-----------------------------|--------|----|
| 1 | Dénaturation initiale | 95 °C | 10 min | non | 1 | |
| 2 | Amplification | Dénaturation | 94 °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 (par exemple, témoins négatifs), le résultat peut être exprimé comme suit: «indéterminé», «pas d'amp.» ou nombre maximal de cycles de réaction effectués. Si l'amplification de la séquence cible d'ADN se produit dans un échantillon (par exemple, témoins positifs), il convient qu'une courbe d'amplification de forme sigmoïde soit observée. Le nombre de cycles au point de franchissement de la courbe d'amplification et du seuil de fluorescence est calculé (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 de *P-nos* ou *P-nos-nptII* est considérée comme détectée si:

- en utilisant les amorces spécifiques à la séquence *P-nos*, p-nos-F1 et p-nos-R et la sonde p-nos-Tm ou les amorces spécifiques à la séquence *P-nos-nptII*, p-nos-F2 et NPTIIR et la sonde NPTII-Tm2, une courbe d'amplification de forme sigmoïde est observée et une valeur C_t ou une valeur C_p est calculée;
- dans les réactions PCR témoins sans ADN ajouté (témoin de réactif pour PCR, témoin négatif d'extraction), aucune amplification ne s'est produite; 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.

9 État de validation et critères de performance

9.1 Généralités

La validation s'est déroulée selon un processus en deux parties:

- a) validation en interne suivie d'un essai interlaboratoires pilote;
- b) validation par un essai interlaboratoires.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ec119d0-8d9c-4612-9ab6-155c8c081/iso-ts-21569-4-2016>

9.2 Robustesse de la méthode

La robustesse des méthodes spécifiques aux éléments *P-nos* et *P-nos-nptII* a été évaluée dans le cadre d'un essai interlaboratoires pilote auquel ont pris part quatre laboratoires, par rapport aux modifications des conditions des facteurs suivants: appareils de PCR en temps réel ¹⁾ (ABI7900, ABI7900HT, ABI 7500 et LC480), kits PCR mélanges maîtres et volumes PCR (mélange maître Qiagen Quantitect, mélange maître universel TaqMan® et mélange maître pour sondes Roche, 19 µl ou 21 µl de mélange maître plus 5 µl d'ADN échantillon), températures d'hybridation (59 °C et 61 °C), concentration d'amorce et de sonde (réduites de 30 %). Pour chaque facteur évalué, 3 répétitions de PCR ont été analysées avec 20 copies chacune de la séquence cible. Dans ces conditions modifiées, tous les mélanges réactionnels pour PCR ont donné des résultats positifs; de ce fait, la méthode peut être considérée comme robuste.

9.3 Essai interlaboratoires

La fiabilité des méthodes a été évaluée dans le cadre d'un essai interlaboratoires auquel ont pris part 12 participants, conformément à l'ISO 5725 (toutes les parties). Cet essai interlaboratoires a été organisé par le Bureau fédéral allemand pour la protection des consommateurs et la sécurité des aliments (BVL). Pour les analyses, les participants ont reçu 24 échantillons d'ADN contenant différentes concentrations de la séquence *P-nos-nptII* et 12 échantillons d'ADN ne contenant pas cette séquence. Tous les échantillons ont été identifiés par des codes randomisés.

Les séquences *P-nos* et *P-nos-nptII* sont utilisées pour les modifications génétiques dans différentes espèces de plantes. L'essai interlaboratoires a utilisé du colza génétiquement modifié (Topas19/2), de la pomme de terre génétiquement modifiée (EH92-527-1) et des plantes non génétiquement modifiées en

1) Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.