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

Partie 6:
**Méthodes de criblage par PCR en
temps réel pour la détection des
séquences ADN *cry1Ab/Ac* et *Pubi-cry***

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

*Part 6: Real-time PCR based screening methods for the detection of
cry1Ab/Ac and *Pubi-cry* DNA sequences*

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO/TS 21569-6:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/11574804-d3e1-4745-ac19-d3fd3fcb770/iso-ts-21569-6-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/11574804-d3e1-4745-ac19-d3fd3fcb770/iso-ts-21569-6-2016>



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	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 des échantillons 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.....	5
9.3 Essai interlaboratoires.....	5
9.4 Sensibilité.....	7
9.5 Spécificité.....	8
10 Rapport d'essai	10
Bibliographie	11

ISO/TS 21569-6:2016
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/11574804-d3e1-4745-ac19-d3fd3fcb770/iso-ts-21569-6-2016>

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'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 6:

Méthodes de criblage par PCR en temps réel pour la détection des séquences ADN *cry1Ab/Ac* et *Pubi-cry*

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détection d'une séquence d'ADN du gène *cry1Ab/Ac* modifié et une méthode de détection de la séquence d'ADN de transition entre le promoteur de l'ubiquitine du maïs (*Pubi*) et le gène *cry1Ab/Ac*. Le gène *cry1Ab/Ac* modifié et le construit *Pubi-cry* sont fréquemment observés dans les plantes génétiquement modifiées contenant le gène Bt. Les deux méthodes 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.

Le présent document est applicable à l'analyse de l'ADN extrait de produits alimentaires. Il peut être également utilisé 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.

2 Références normatives

<https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/iso/11574804-d3e1-4745-ac19-d3fd3fcb770/iso-ts-21569-6-2016>

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 la prise d'essai en appliquant une méthode appropriée (voir l'ISO 21571). L'analyse de l'ADN comprend deux parties:

- 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];
- détection de la séquence d'ADN *cry1Ab/Ac* et/ou la séquence d'ADN *Pubi-cry* par une PCR en temps réel, voir les Références [2] et [3].

5 Réactifs et matériaux

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 la séquence *cry1Ab/Ac*

Nom	Séquence d'ADN de l'oligonucléotide	Concentration finale dans la PCR
<i>cry1Ab/Ac</i> comme séquence cible ^[2] :		
Bt-F1(mod)	5'-gAg gAA ATg CgT ATT CAA TTC AAC-3'	400 nmol/l
Bt-R	5'-TTC Tgg ACT gCg AAC AAT gg-3'	400 nmol/l
Bt-P	5'-(FAM)-ACA TgA ACA gCg CCT TgA CCA CAg C-(NFQ)-3' ^a	100 nmol/l

^a FAM: carboxy-6-fluorescéine, NFQ: chromophore extincteur non fluorescent (Dark Quencher).