ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 21571— 2014

Продукты пищевые

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ ПРОДУКТОВ

Экстракция нуклеиновых кислот

ISO 21571:2005
Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction (IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева» Российской академии наук (ИФР РАН) на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 447 «Биологическая безопасность пищевых продуктов, кормов и товаров народного потребления и методы ее контроля»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 ноября 2014 г. № 1656-ст.

4 Настоящий стандарт является идентичным международному стандарту ИСО 21571:2005 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот» (ISO 21571:2005 «Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction»), включая техническую поправку: Amd.1:2013.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Принципы . . . 1
3.1 Общие положения . . . 1
3.2 Экстракция ДНК . . . 2
3.3 Количественная оценка содержания ДНК . . . 2
4 Общие требования к лаборатории . . . 2
5 Методика . . . 2
5.1 Приготовление проб для анализа . . . 2
5.2 Экстракция и очистка ДНК . . . 4
5.3 Количественная оценка экстрагированной ДНК . . . 5
5.4 Стабильность выделенной ДНК . . . 6
6 Оценка результатов . . . 6
7 Протокол испытаний . . . 6
Приложение А (обязательное) Методы экстракции ДНК . . . 7
А.1 Получение применимой для ПЦР ДНК методами экстракции ДНК на основе фенола/хлороформа . . . 7
А.1.1 Основной метод на основе фенола/хлороформа . . . 7
А.1.2 Метод на основе фенола/хлороформа. Процедура для заквасочных культур колбас, подвергаемых ферментации . . . 9
А.1.3 Метод на основе фенола/хлороформа. Процедура для заквасочных культур йогурта . . . 11
А.1.4 Метод на основе фенола/хлороформа. Процедура для дрожжей и/или гифомицетов, собранных с пищевых продуктов . . . 14
А.2 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе поливинилпирролидона (ПВП) . . . 16
А.2.1 Основной метод на основе ПВП . . . 16
А.3 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе ЦТАБ . . . 18
А.3.1 Основной метод на основе ЦТАБ . . . 18
А.4 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе диоксида кремния . . . 20
А.4.1 Основной метод на основе диоксида кремния . . . 20
А.5 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе гуанидина-хлороформа . . . 22
А.5.1 Основной метод на основе гуанидина-хлороформа . . . 22
А.5.2 Гуанидин хлороформный метод: Протокол для соевого лецитина . . . 24
Приложение В (обязательное) Методы количественной оценки выделенной ДНК . . . 30
В.1 Основной метод ультрафиолетовой спектрометрии . . . 30
В.2 Метод электрофореза в агарозном геле и окрашивания бромистым этидием . . . 31
В.3 Метод ПЦР в реальном времени для количественного анализа выделенной ДНК . . . 34
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации . . . 35
Библиография . . . 36

Введение

Исследование генетически модифицированных организмов (далее — ГМО) и производных продуктов осуществляется посредством следующих стадий, выполняемых последовательно или одновременно. После отбора проб нуклеиновые кислоты выделяются из анализируемой пробы. Выделенные нуклеиновые кислоты далее могут быть очищены от возможных примесей в самом процессе выделения или после него. Следующими этапами являются: оценка количества выделенных нуклеиновых кислот (при необходимости), разведение нуклеиновых кислот (при необходимости) и выполнение аналитических процедур, например полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР). Указанные этапы подробно изложены в настоящем стандарте и следующих международных стандартах:

- ИСО 21568 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Отбор проб»;
- ИСО 21569 «Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Качественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте»;
- ИСО 21570 «Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте».

Дополнительная информация об общих требованиях и определениях, относящихся к упомянутым выше этапам, приведена в ИСО 24276 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Общие требования и определения».

В 2013 г. в ИСО 21571:2005 была внесена техническая поправка № 1 (Amd.1:2013) в части уточнения условий экстракции ДНК и добавления нового подраздела А.5.2 (приложение А), касающегося применения гуанидин-хлороформного метода для соевого лецитина. В настоящем стандарте техническая поправка № 1 выделена на полях одиночной вертикальной чертой.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Продукты пищевые

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ ПРОДУКТОВ

Экстракция нуклеиновых кислот

Foodstuffs. Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products. Nucleic acid extraction

Дата введения — 2015—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования и специфические методы выделения, очистки и количественной оценки дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее — ДНК). Эти методы изложены в приложениях А и В.

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, но может быть также применен к другим продуктам, например семенам и кормам.

Настоящий стандарт следует применять совместно с ИСО 21569, ИСО 21570 в части аналитических методов на основе нуклеиновых кислот, в частности качественных аналитических методов, установленных в ИСО 21569, и количественных аналитических методов, установленных в ИСО 21570.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта.

ИСО 24276:2006 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Общие требования и определения (ISO 24276:2006, Foodstuffs.Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products. General requirements and definitions)

ИСО 21568:2003 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Отбор образцов (ISO 21658:2003, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Sampling)

3 Принципы

3.1 Общие положения

Основная цель применения методов экстракции нуклеиновых кислот — обеспечение выделения нуклеиновых кислот, пригодных для последующего анализа (см. ИСО 24276).

Примечание — «Качество» ДНК зависит от средней длины экстрагированных молекул ДНК, химической чистоты и структурной целостности одной нити и двойной спирали ДНК (например, внутри- и межцепочечные связи оснований ДНК, выпадение оснований в цепочке ДНК, перекрестные сшивки с высокомолекулярными спиртами,

Издание официальное

геномом и т. д.). Кроме того, такие структурные изменения часто являются специфичными для определенной последовательности ДНК и поэтому не распределены по геному случайным образом (см. [1]—[4]).

Пользователям настоящего стандарта необходимо иметь в виду, что некоторые методы (например, методы на основе диоксида кремния) могут быть запатентованы.

3.2 Экстракция ДНК

Основной принцип выделения присутствующей в пробе ДНК заключается в одновременной или последующей очистке ДНК от ингибиторов полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Методы выделения и очистки ДНК изложены в приложении А. Выбор метода основывается на опыте пользователя с учетом области применения и примеров продуктов, которые указаны в каждом методе.

Альтернативные методы могут применяться при условии, что метод был проверен на соответствующем продукте, подлежащем исследованию.

3.3 Количественная оценка содержания ДНК

Количественная оценка экстрагированной ДНК может потребоваться для последующего ПЦР-анализа.

Такая оценка может выполняться либо физическими (например, измерением поглощения при специфической длине волны), физико-химическими (например, применением интеркалирующих или связующих агентов, обладающих флюоресцентными свойствами), ферментативными (например, биолюминесцентным обнаружением) методами, либо путем количественной ПЦР. Последний метод применяется для продуктов сложного состава, проб с низким содержанием ДНК или проб, в которых ДНК подверглась деградации.

Существует несколько методов, применяемых для определения количества ДНК, присутствующей в растворе. Эти методы изложены в приложении В.

Выбор наиболее подходящего метода осуществляется пользователем в зависимости от количества и качества ДНК, подлежащей количественному определению, а также от продукта, из которой была экстрагирована ДНК.

Альтернативные методы могут применяться при условии, что метод был проверен на соответствующем продукте.

4 Общие требования к лаборатории

Вследствие воздействия пыли и распыляемых аэрозолей может происходить случайная контаминация ДНК, поэтому организация рабочих мест в лаборатории основывается на строгом соблюдении:

- последовательности всех установленных методологических этапов, используемых для получения промежуточных и конечных результатов;
- принципа «прямого потока» при обращении с пробами.

Использование последнего принципа гарантирует, что ДНК, подлежащая анализу, и полученная в результате ПЦР амплифицированная ДНК, остаются физически разделенными.

Дополнительные требования к лабораториям приведены в ИСО 24276.

5 Методика

5.1 Приготовление проб для анализа

5.1.1 Общие положения

Специфические параметры анализируемого продукта (например, влажность) и его обработка могут влиять на количество и качество ДНК, выделяемой из анализируемого продукта. В связи с этим рабочие характеристики применяемого метода экстрагирования ДНК зависят от конкретного анализируемого продукта.

Необходимо принять соответствующие меры, чтобы гарантировать, что проба для анализа является представительной, отобранной из лабораторной пробы.

Проба для анализа должна быть достаточной(го) массы (объема) и содержать достаточное количество молекул ДНК для обеспечения представительности лабораторной пробы.

Исходя из практических и технических соображений не рекомендуется, чтобы масса пробы для анализа превышала 2 г.

Любые ограничения, связанные с массой (объемом) пробы для анализа, не позволяющие рассматривать ее как представительную, должны быть учтены при интерпретации аналитических результатов и указаны в протоколе испытаний.

Методы экстракции ДНК, приведенные в приложении А, устанавливают массу пробы для анализа от 200 до 500 мг, что обычно является приемлемым для продукции с высоким содержанием ДНК (молотое зерно, мука). Однако некоторые продукты содержат очень малое количество ДНК или деградировавшую ДНК, в связи с этим указанная масса пробы не позволит выделить достаточное для анализа количество ДНК. В таких случаях масса (объем) пробы может быть увеличена.

Выделение ДНК должно выполняться не менее чем из двух параллельных проб одной и той же продукции.

Хранение стандартных образцов, лабораторных проб и анализируемых проб должно соответствовать требованиям ИСО 24276 и быть организовано таким образом, чтобы анализируемые биохимические параметры были сохранены (подробнее см. ИСО/МЭК 17025).

5.1.2 Пробы

Все операции по приготовлению лабораторных проб (например, измельчение, гомогенизация, деление, высушивание) должны выполняться в соответствии с лабораторными правилами, описанными в ИСО 24276:2006 (пункт 5.3.2). При выполнении всех необходимых операций должны быть приняты меры предосторожности для защиты лабораторной пробы от загрязнения или изменения ее состава.

Лабораторные пробы должны быть достаточно гомогенными перед измельчением или размолом и перед отбором анализируемой пробы.

В случае жидких проб сосуд с пробой необходимо встряхивать для обеспечения гомогенизации продукта. В случае негомогенных продуктов типа неочищенных масел необходимо убедиться, что осадок и все нерастворимые составляющие полностью удалены со стенок сосуда.

В случае твердых проб, которые не могут быть суспендированы без затруднений, лабораторная проба должна быть размолота для уменьшения размера частиц и/или облегчения экстрагируемости ДНК. В таких случаях особое внимание необходимо обратить на размер частиц. Проба для анализа, подвергаемая экстракции, должна содержать минимальное количество частиц. Необходимо, чтобы оборудование, предназначенное для дробления и измельчения проб, было легко моющимся по всей рабочей поверхности и обеспечивало требуемое количество и распределение по размерам частиц (гранулометрический состав) анализируемой пробы.

Если какие-либо компоненты лабораторной пробы были удалены до проведения экстракции ДНК, то это должно быть указано в протоколе испытаний с описанием проведенных операций.

Для твердых или пастообразных готовых пищевых продуктов с высоким содержанием липидов достаточно трудно достичь требуемого размера частиц за один этап измельчения. В таких случаях допускается перед измельчением применять дополнительные процедуры, такие как удаление липидов гексаном после промежуточного измельчения, замораживание или сублимационная сушка.

Для улучшения измельчения пастообразных или вязких продуктов в некоторых случаях можно использовать одну из следующих обработок:

- нагрев до максимальной температуры 40 °С;
- растворение в соответствующей жидкости, например в воде;
- замораживание при температуре минус 20 °С или ниже.

После такой обработки необходимо гомогенизировать всю лабораторную пробу. Затем необходимо отобрать две параллельные анализируемые пробы с учетом возможного проведения в дальнейшем процедур разбавления или концентрирования.

Во время проведения процедур размола и измельчения необходимо соблюдать меры, гарантирующие нагрев лабораторной пробы на минимальном уровне и не допускающие ее сильного нагревания, так как нагрев может отрицательно воздействовать на качество выделяемой ДНК.

По возможности необходимо избегать способов размола/измельчения, при которых возникает высокий риск перекрестного загрязнения (например, комбинированное использование жидкого азота и ступки, а также использование одной и той же ступки для разных образцов). Одним из основных требований является необходимость изолирования любого методологического этапа, при проведении которого происходит образование пыли, от всех других аналитических этапов и процедур.

В случае присутствия в лабораторной пробе солей, специй, сахарной пудры и/или других веществ, которые потенциально могут оказывать влияние на выделение ДНК или последующий аналитический метод, должны быть предприняты дополнительные соответствующие процедуры очистки в соответствии с используемым методом (см. приложение А).

Например, в случае образцов сложного состава целевой материал для исследования (например, панировочный слой рыбных палочек) может быть отделен от остальной части продукта для выделения ДНК.

5.2 Экстракция и очистка ДНК

5.2.1 Общие положения

При разработке методов выделения ДНК необходимо учитывать следующие требования.

Качество и выход экстрагированной нуклеиновой кислоты при использовании того или иного метода для того или иного продукта должны быть как повторяемыми, так и воспроизводимыми при условии содержания достаточного количества нуклеиновой кислоты в анализируемой пробе, из которой она была выделена.

Для получения ДНК хорошего качества рекомендуется при необходимости удалить следующие компоненты:

- полисахариды (пектин, целлюлозу, гемицеллюлозу, крахмал, загустители и т. д.) путем обработки соответствующим ферментом (например пектиназой, целлюлазой, гемицеллюлазой, α-амилазой) или экстрагирования органическим растворителем (например гексадецилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ)/хлороформ);
- рибонуклеиновые кислоты (далее — РНК) и/или белки путем соответствующей обработки, например ферментативной обработки рибонуклеазой и протеиназой соответственно;
- липидные фракции путем ферментативной обработки или использования растворителей (например гексана);
- солей (например из буфера для выделения и лизиса, добавляемых в раствор на стадии осаждения), способных оказывать влияние на последующий анализ.

В частности, в случае твердых или высушенных проб объем буфера для выделения и лизиса должен быть таким, чтобы гарантировать растворение в нем ДНК.

Примечание — Очистка ДНК может выполняться различными способами, например путем фракционного осаждения с использованием таких растворителей, как фенол, хлороформ, этанол, изопропанол, и/или с использованием адсорбции на твердые матрицы (ионообменную смолу, силикагель или жидкое стекло, диатомовую землю, мембраны и т. д.). Можно объединить несколько принципов очистки ДНК. При необходимости выделение и очистка могут совмещаться путем выполнения на одном и том же этапе.

В случае использования соосадителей ДНК, например гликогена, полиэтиленгликоля (ПЭГ), транспортной РНК (т-РНК), для увеличения выхода ДНК в ходе стадий осаждения они не должны обладать нуклеазной активностью (содержать детектируемый уровень нуклеаз), содержать ингибиторы и/или конкуренты ПЦР или последовательности нуклеиновых кислот, гомологичные анализируемым последовательностям. При выделении ДНК из генетически модифицированных растений в качестве соосадителя может быть использована ДНК-носитель, например ДНК из спермы лосося или сельди.

При использовании сублимационных сушилок для высушивания осадка ДНК, полученного после стадии осаждения, необходимо учитывать риск перекрестного загрязнения.

Необходимо повторно растворяют ДНК в воде или буферном растворе для предотвращения деградации ДНК.

Пример — Для ресуспендирования или разбавления ДНК пригоден трис/ЭДТА (1× или 0,1×) с 8,0 ед. pH.

При применении нового метода выделения ДНК или одного из методов, описанных в приложении А, для новых продуктов потенциальные качество и целостность выделенной ДНК с использованием выбранного метода должны быть проверены следующим образом: путем добавления в лизирующий буфер известного количества меченой ДНК вместе с пробой, из которой необходимо выделить ДНК. Если оценка нового метода производится на основании использования меченой ДНК, количество (масса) которой известно, или подсчета количества копий определенной последовательности ДНК, необходимо оценить возможную перекрестную реактивность такой ДНК с ДНК, содержащейся в исследуемой пробе.

Примечание — Использование меченой ДНК является наилучшим приближением к реальной ситуации, когда предполагается образование комплекса ДНК данного продукта с другими компонентами (например белками).

Такой метод также может использоваться для оценки присутствия растворимых ингибиторов ПЦР в выделенной ДНК (см. ИСО 24276, ИСО 21569 и ИСО 21570).

Однако меченая ДНК может привести к ложному представлению о степени извлечения ДНК, так как она может гораздо легче выделяться из продукта, чем целевая ДНК.

5.2.2 Процедуры контроля

Процедуры контроля, подлежащие использованию при проведении анализа, описаны в таблице 1 ИСО 24276. Они должны включать, как минимум, отрицательный и положительный контроли экстрагирования, а также могут включать контроль окружающей среды.

5.2.3 Контроль чистоты ДНК. Внутренний контроль ПЦР

При отработке нового метода экстрагирования присутствие ингибиторов ПЦР в экстрагированной ДНК может быть оценено с помощью внесения чужеродной ДНК (внутренний стандарт, см. ИСО 24276, ИСО 21569 и ИСО 21570). Количество добавленной ДНК не должно превышать максимальный уровень, допустимый для применяемой системы ПЦР, и должно содержать установленное число копий последовательности целевой ДНК. Это число необходимо определять отдельно для каждой последовательности целевой ДНК и указывать как кратное нижнему пределу обнаружения. В идеальном случае концентрация целевой ДНК в ПЦР при положительном контроле должна соответствовать чувствительности, требуемой для анализа. При использовании в качестве положительного контроля ПЦР высококонцентрированной клонированной целевой последовательности ДНК необходимо соблюдать осторожность из-за высокой опасности перекрестного загрязнения. По возможности нуклеиновые кислоты положительного контроля должны максимально соответствовать параметрам нуклеиновых кислот исследуемого материала.

5.3 Количественная оценка экстрагированной ДНК

5.3.1 Общие положения

Качество, целостность и количество экстрагированной нуклеиновой кислоты оказывают влияние на рабочие характеристики аналитического метода и, следовательно, на полученные аналитические результаты. Предел обнаружения конкретного метода может, таким образом, зависеть от количества использованных нуклеиновых кислот. Необходимо определить общее количество ДНК, которое используется в ПЦР, равно как и общее количество ДНК целевого таксона, так как ДНК нецелевого таксона может повлиять на эффективность ПЦР.

Количественная оценка ДНК помогает:

- при определении эффективности различных методов выделения ДНК для определенного вида объектов (повторяемость);
- измерении концентрации нуклеиновых кислот перед анализом.

5.3.2 Область применения

Каждый метод количественной оценки должен применяться в пределах его динамического диапазона с учетом уровня точности измерения.

5.3.3 Количественные стандарты

Точность методов количественной оценки зависит от стандартов нуклеиновых кислот, используемых для калибровки метода.

При использовании метода, чувствительного к размеру и/или качеству фрагментов нуклеиновой кислоты, должны применяться стандарты нуклеиновой кислоты, которые соответствуют ожидаемым размеру и/или качеству нуклеиновой кислоты, экстрагированной из пробы.

Используемый контрольный материал (национальный или международный стандартный образец) должен обеспечивать проявление заявленных характеристик по непрерывной цепи при сравнении со стандартами национального или международного эталона (см. Руководство ИСО 30).

При применении метода с использованием интеркалирующих (встраивающихся в ДНК) агентов необходимо применять стандарт ДНК с высокой молекулярной массой, если количественной оценке подлежит ДНК с высокой молекулярной массой. Соответственно необходимо использовать стандарт ДНК с низкой молекулярной массой при количественной оценке ДНК с низкой молекулярной массой. Нуклеиновая кислота с высокой молекулярной массой, как правило, содержит некоторое количество фрагментов с более низкой молекулярной массой. Это означает, что многие методы количественной оценки ДНК имеют определенную степень неточности, которую необходимо учитывать при оценке результатов.

Примечание — Кроме того, в зависимости от исследуемого материала и применяемого метода выделения некоторая часть ДНК может быть извлечена в виде одноцепочечной ДНК (которая имеет гораздо более низкую способность к интеркаляции), что приводит к занижению общего содержания ДНК. С другой стороны, одноцепочечная ДНК также хорошо обнаруживается путем физических измерений.

Для построения калибровочного графика требуется не менее трех точек, предпочтительно в нескольких повторностях. Количество стандартной ДНК, использованной для каждой точки калибровочного графика, зависит от чувствительности метода и динамического диапазона измерений.

5.4 Стабильность выделенной ДНК

Выделенная из пробы ДНК должна храниться в условиях, которые обеспечивают ее стабильность для проведения последующих анализов.

Следует избегать многократного замораживания и оттаивания растворов ДНК.

6 Оценка результатов

Применяемый метод экстракции ДНК должен обеспечивать получение нуклеиновой кислоты, качество и количество которой соответствуют требованиям последующих анализов.

Качество выделенных нуклеиновых кислот должно быть удостоверено соответствующим аналитическим методом с регистрацией и оценкой параметров, аналогичных используемым при предстоящем анализе (например, если анализ, который будет выполнен, это ПЦР, качество выделенной ДНК должно быть оценено с использованием соответствующего ПЦР-контроля).

Дополнительные параметры для оценки совместимости метода указаны в ИСО 21569, ИСО 21570 и ИСО 24276.

7 Протокол испытаний

В случае представления протокола испытаний в соответствии с ИСО 24276 в него должна быть включена следующая дополнительная информация о деятельности лаборатории:

- описание происхождения проб для анализа и предварительной обработки пробы перед экстракцией нуклеиновой кислоты;
- масса проб для анализа, используемых для экстракции нуклеиновой кислоты;
- используемый метод экстракции нуклеиновой кислоты;
- любые нетипичные ситуации, наблюдаемые во время проведения испытаний;
- любая операция, не указанная в методе или рассматриваемая как необязательная, которая может оказать влияние на результаты;
- оценка результатов;
- персонал.

Обработка и хранение исходных данных изложены в ИСО/МЭК 17025.

Приложение А
(обязательное)

Методы экстракции ДНК

А.1 Получение применимой для ПЦР ДНК методами экстракции ДНК на основе фенола/хлороформа

А.1.1 Основной метод на основе фенола/хлороформа

А.1.1.1 Общие положения

Настоящий метод является общепринятым (см. [5]) и применяется для экстракции ДНК из большой группы продуктов (см. А.1.1.8).

Фенол обычно подходит для деструкции нуклеаз и денатурации белка.

При исследовании листьев или зеленой массы растений (например, листьев цикория, высушенной люцерны) вместе с ДНК могут совместно осаждаться многие ингибиторы ПЦР. По этой причине могут возникнуть трудности, связанные с воспроизводимостью получения ДНК, амплифицируемой в ПЦР.

С учетом агрессивных и опасных свойств фенола в качестве альтернативы целесообразно применять методы экстрагирования ДНК, основанные на ЦТАБ и/или поливинилпирролидоне (ПВП) и/или на адсорбции диоксидом кремния.

А.1.1.2 Статус валидации

Этот метод широко применяется во всех областях биологии, агрономии и медицины на протяжении 40 лет, однако он никогда не подвергался оценке путем межлабораторных исследований для обнаружения ГМО в пищевых продуктах.

А.1.1.3 Принцип метода

Метод включает стадию лизиса (термический лизис в присутствии додецилсульфата натрия и высокой концентрации этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и последующее удаление загрязняющих примесей (например, липофильных молекул, полисахаридов и белков) и нуклеаз из водной фазы, содержащей ДНК, с помощью фенола и хлороформа. Заключительное осаждение этиловым спиртом концентрирует ДНК и удаляет соли и остаточный хлороформ. Критическим этапом метода является стадия лизиса [5].

А.1.1.4 Меры предосторожности

Работы с органическими реактивами необходимо выполнять в вытяжном шкафу.

А.1.1.5 Реактивы

А.1.1.5.1 Этиловый спирт (C_2H_5OH), 96 %-ный

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.1.5.2 Ледяная уксусная кислота, CH_3COOH.

А.1.1.5.3 Калия ацетат, $C_2H_3O_2K$.

А.1.1.5.4 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.1.1.5.5 Изоамиловый спирт [$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$].

А.1.1.5.6 Фенол, C_6H_5OH.

А.1.1.5.7 Хлороформ, $CHCl_3$.

А.1.1.5.8 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.1.1.5.9 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двукалиевая соль (K_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8K_2$.

А.1.1.5.10 Калия гидроксид, KOH.

А.1.1.5.11 Калия хлорид, KCl.

А.1.1.5.12 Натрия додецилсульфат (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

А.1.1.5.13 Протеиназа К, приблизительно 20 ед./мг лиофилизата.

А.1.1.5.14 Рибонуклеаза-А, выделенная из бычьей поджелудочной железы, очищенная от ДНК, приблизительно 50000 ед./мг лиофилизата.

А.1.1.5.15 Уравновешенный фенол, > 7,8 ед. pH

Используется фенол, уравновешенный буфером для экстрагирования/лизиса (А.1.1.5.18), без SDS, или приготовленный в соответствии с [5] или рекомендациями изготовителя.

А.1.1.5.16 Смесь хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают 24 объемные части хлороформа (А.1.1.5.7) и одну объемную часть изоамилового спирта (А.1.1.5.5).

А.1.1.5.17 Смесь фенол — хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают одну объемную часть уравновешенного фенола (А.1.1.5.15) и одну объемную часть смеси хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.1.5.16).

А.1.1.5.18 Буфер для экстрагирования/лизиса

Молярные концентрации компонентов: Трис = 0,050 моль/дм^3, K_2ЭДТА = 0,050 моль/дм^3; массовая концентрация SDS = 30 г/дм^3. Доводят pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или KOH.

А.1.1.5.19 Буфер ТЕ, Трис = 0,010 моль/дм^3, K_2ЭДТА = 0,001 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или KOH.

А.1.1.5.20 Раствор протеиназы-К в стерильной воде, 20 мг/см^3.

Автоклавирование раствора не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.1.5.21 Раствор рибонуклеазы-А, 10 мг/см^3 лиофилизата

Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.1.5.22 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный.

Следует хранить при температуре минус 20 °С.

А.1.1.5.23 Раствор ацетата калия, ($C_2H_3O_2K$), 3 моль/дм^3

Доводят значение pH до 5,2 ед. pH ледяной уксусной кислотой. Автоклавирование раствора не допускается. При необходимости пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

А.1.1.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.1.1.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение не менее 10000 *g*. На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.1.1.6.2 Водяная баня или инкубатор с рабочим диапазоном температур от 60 °С до 70 °С.

А.1.1.6.3 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.1.1.6.4 Сублимационная сушилка (при необходимости).

А.1.1.6.5 Встряхиватель, например Vortex[1)].

А.1.1.6.6 Реакционные сосуды, способные выдержать заморозку в жидком азоте.

А.1.1.7 Методика

А.1.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления анализируемой пробы из исследуемого продукта необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК. При изменении размера анализируемой пробы необходимо соответственно скорректировать массы и объемы реактивов и буферных растворов.

А.1.1.7.2 Методика выделения

Взвешивают 0,25 г анализируемой пробы в микропробирке. Добавляют 1,6 см^3 буфера для экстрагирования/лизиса (А.1.1.5.18) и в случае необходимости (например, для проб с высоким содержанием белка) 50 мм^3 раствора протеиназы-К (А.1.1.5.20). Инкубируют при температуре от 60 °С до 70 °С, обычно в течение от 30 мин до 2 ч (также возможно инкубирование в течение ночи). Добавляют рибонуклеазу-А (А.1.1.5.21) до конечной массовой концентрации 0,1 мкг/см^3. Центрифугируют при ускорении 5000 *g* в течение 30 мин. Извлекают образовавшийся верхний слой (супернатант) и переносят в чистую пробирку. Добавляют к нему один объем уравновешенного фенола (А.1.1.5.15), затем осторожно и тщательно перемешивают. Центрифугируют при ускорении 5000*g* в течение 15 мин, переносят верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Добавляют к верхнему слою один объем смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.1.5.17), затем осторожно и тщательно перемешивают. Центрифугируют при ускорении 5000*g* в течение 15 мин, переносят верхнюю водную фазу в чистую пробирку. В зависимости от состава анализируемой пробы (продукта) данную процедуру повторяют один или несколько раз до тех пор, пока граница раздела фаз не станет четкой.

Добавляют к верхнему слою один объем смеси хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.1.5.16), затем осторожно и тщательно перемешивают. Центрифугируют при ускорении 5000 g в течение 10 мин и переносят верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Повторяют до тех пор, пока граница раздела фаз не станет четкой. Смешивают образовавшийся верхний слой с 0,1 объема раствора ацетата калия (А.1.1.5.23) и 2,5 объема 96 %-ного этилового спирта (А.1.1.5.1), затем тщательно перемешивают, переворачивая пробирки. Выдерживают в течение по меньшей мере 5 мин в жидком азоте или 1 ч при температуре минус 80 °С, или всю ночь при температуре минус 20 °С. Центрифугируют при ускорении 10000*g* (или до 13000*g*) при температуре 4 °С в течение по меньшей мере 15 мин, затем осторожно сливают образовавшийся верхний слой.

Тщательно промывают осадок ДНК в пробирке после центрифугирования двумя объемами 70 %-ного раствора этилового спирта (А.1.1.5.22). Центрифугируют при ускорении от 10000*g* до 13000*g* при температуре 4 °С в течение 15 мин, затем осторожно сливают образовавшийся верхний слой. Эта стадия является особенно важной для удаления осаждающихся солей, которые могут оказать влияние на последующий анализ (например, ПЦР).

Высушивают осадок в пробирке после центрифугирования и повторно растворяют его в 100 мм^3 воды или соответствующего буфера, например буфера ТЕ (А.1.1.5.19). Полученный раствор представляет собой основной раствор ДНК. Добавляют рибонуклеазу-А (А.1.1.5.21) до конечной массовой концентрации 0,1 мкг/см^3.

---

1) Vortex — это пример коммерчески доступного оборудования, пригодного для использования с описываемым методом. Эта информация приводится исключительно для информации пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением конкретного типа оборудования. Допускается использование аналогичного оборудования, при условии, что оно позволяет получать такие же результаты.

А.1.1.8 Перечень примеров

Описанный метод был успешно применен для экстрагирования ДНК[1)] из следующих продуктов: квашеные соевые бобы[1)], обезвоженная люцерна, детское сухое печенье[1)], детское молоко[1)], бактерии и их споры, семена ячменя, говяжий/свиной паштет[1)], пиво[1)], «голубой сыр», шоколадное пирожное с орехами[1)], консервированная кукуруза, семена моркови, брикетированный зерновой концентрат[1)], сыр, наггетсы куриные, листья цикория, корни цикория, печенье, глазированное шоколадом[1)], шоколадная паста[1)], печенье с корицей[1)], компоты, кукурузные хлопья[1)], дробленый рис, десертный крем[1)], высушенные семена гороха, кукурузное печенье, кормовой кукурузный жмых, кукурузная мука, кукурузный глютеновый корм, семена кукурузы, гранулированный корм из маниоки, мясо в муке из маниоки, мясо свежее и подвергнутое тепловой обработке[1)] (говядина, свинина, курица и индейка), мякоть дыни, семена дыни, рубленое мясо, ингредиенты мюсли, мюсли[1)], побеги золотистой фасоли[1)], семена овса, клубни картофеля, кормовой рапсовый жмых, «глупаколца», семена рапса, колбаса (реализуемая в ломтиках[1)] и комбинированная[1)] (см. А.1.2 для усовершенствованного метода экстракции ДНК), шницель, суповые шарики, соевый белок в мясных продуктах[1)], соевый лецитин (необработанный коричневый и желтый рафинированный[1)]), побеги сои[1)], соевые напитки, соя, соевый крем, кормовой соевый жмых, соевый творог, соус для спагетти[1)], семена полбы, сахарная свекла (сушеный жом), сахарная свекла (свежие корнеплоды), семена сахарной свеклы, семена подсолнечника, тофу (японский соевый творог), свежие томаты, томатная паста[1)], семена томатов, вегетарианский гамбургер, вафли (с шоколадом[1)] и без шоколада[1)]), пшеничные отруби, пшеничная мука, глютеновый корм из пшеницы, семена пшеницы, крупка из твердой пшеницы, йогурт[1)] (см. А.1.3 для усовершенствованного метода экстрагирования).

А.1.2 Метод на основе фенола/хлороформа. Процедура для заквасочных культур колбас, подвергаемых ферментации

А.1.2.1 Общие положения

Этот метод предназначен для экстракции суммарной ДНК, включая бактериальную геномную ДНК, из колбас. Применимость метода для получения ДНК высокого качества, пригодной для специфического обнаружения рекомбинантной ДНК с использованием ПЦР, была продемонстрирована на колбасах, подвергнутых ферментации [6], а также на колбасах, подвергнутых ферментации и термической обработке, так называемых «летних колбасах» [7]. Кроме того, было показано, что настоящий метод экстракции пригоден для выделения суммарной ДНК из сливок специально для обнаружения *Staphylococcus aureus* в этом пищевом продукте [8]. (Перечень продуктов, для которых применим этот метод, приведен в А.1.2.8).

А.1.2.2 Статус валидации

Этот метод был проверен при межлабораторном исследовании проб массой 0,4 г (см. А.1.2.9).

А.1.2.3 Принцип метода

Метод заключается в выделении бактериальных клеток из пищевого продукта путем гомогенизации проб колбас с последующим центрифугированием. Полученный осадок содержит не только бактериальные клетки, но также и частицы мяса. Для проведения специфического лизиса бактериальных клеток их оболочки расщепляют, добавляя лизоцим. Для улучшения расщепления клеточных оболочек молочнокислых бактерий может быть добавлен мутанолизин. Полный лизис клеток происходит при добавлении детергента SDS (додецилсульфата натрия) и протеиназы-К, а затем несколько раз проводится экстрагирование водной фазы фенолом и/или хлороформом. Стадия экстрагирования фенолом/хлороформом является важной для устранения любой нуклеазной активности и ингибиторов ПЦР, включая те, которые возникли из пищевого продукта (например гематина). Последним этапом является осаждение ДНК этиловым спиртом.

А.1.2.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.1.2.5 Реактивы

А.1.2.5.1 Изопропанол [$CH_3CH(OH)CH_3$].

А.1.2.5.2 Этиловый спирт, C_2H_5OH, 96 %-ный

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.2.5.3 Ледяная уксусная кислота, CH_3COOH.

А.1.2.5.4 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.1.2.5.5 Натрия гидроксид, NaOH.

А.1.2.5.6 Изоамиловый спирт [$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$)].

А.1.2.5.7 Фенол, C_6H_5OH.

А.1.2.5.8 Хлороформ, $CHCl_3$.

А.1.2.5.9 Трис (оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.1.2.5.10 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль, (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.1.2.5.11 Натрия додецилсульфат (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

[1)] Повторяемость может зависеть от партии продукта и/или технологии его получения. В некоторых случаях ДНК не может быть обнаружена или она подверглась расщеплению таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых праймеров и/или протоколов ПЦР. Это может быть причиной низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

А.1.2.5.12 Лизоцим

50000 ед./мг белка (1 ед. будет давать ΔA_{450}= 0,001 в минуту при 6,24 ед. pH и температуре 25 °С, используя суспензию *Micrococcus lysodeikticus* в качестве субстрата, в 2,6 см^3 реакционной смеси при длине оптического пути 1 см).

А.1.2.5.13 Сахароза, $C_{12}H_{12}O_{11}$.

А.1.2.5.14 Протеиназа-К, приблизительно 20 ед./мг лиофилизата.

А.1.2.5.15 Натрия ацетат ($C_2H_3O_2Na$).

А.1.2.5.16 Уравновешенный фенол

Используют фенол, уравновешенный буферным раствором Трис/HCl (> 7,8 ед. pH) или приготовленный в соответствии с [5] или рекомендациями изготовителя.

А.1.2.5.17 Смесь хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают 24 объемные части хлороформа (А.1.2.5.8) и одну объемную часть изоамилового спирта (А.1.2.5.6).

А.1.2.5.18 Смесь фенол — хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают 25 объемных частей уравновешенного фенола (А.1.2.5.16) с 24 объемными частями хлороформа (А.1.2.5.8) и одной объемной частью изоамилового спирта (А.1.2.5.6).

А.1.2.5.19 Раствор мутанолизина в стерильной воде, содержащий 500 или 5000 ед./см^3 мутанолизина

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.1.2.5.20 Раствор лизоцима в стерильной воде концентрацией 10 мг/см^3

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.1.2.5.21 Раствор сахарозы, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 400 г/дм^3.

А.1.2.5.22 Буферный раствор А, (Трис) = 0,020 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = 0,020 моль/дм^3, (NaCl) = 0,1 моль/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.1.2.5.23 Буфер для экстрагирования/лизиса, содержащий одну объемную часть буфера А (А.1.2.5.22) и одну объемную часть раствора сахарозы (А.1.2.5.21).

А.1.2.5.24 Раствор SDS, (SDS) = 250 г/дм^3.

А.1.2.5.25 Раствор протеиназы-К концентрацией 20 мг/см^3

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.1.2.5.26 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный

Следует хранить при температуре и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.2.5.27 Раствор натрия ацетата, $C_2H_3O_2Na$ концентрацией 3 моль/дм^3

Доводят значение pH до 5,2 единиц ледяной уксусной кислотой.

А.1.2.5.28 Буфер ТЕ, (Трис) = 0,010 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.1.2.6 Оборудование

А.1.2.6.1 Инструменты для измельчения пробы (например, скальпель).

А.1.2.6.2 Центрифуга, поддерживающая ускорение, как минимум, 12000*g*. На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.1.2.6.3 Водяная баня или инкубатор.

А.1.2.6.4 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.1.2.6.5 Смеситель, например, Vortex.

А.1.2.7 Методика

А.1.2.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления анализируемой пробы из исследуемого продукта необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК. При изменении размера навески пробы требуется соответственно масштабировать массу реактивов и объемы буферов.

А.1.2.7.2 Приготовление пробы

Измельчают колбасу, гомогенизируют и добавляют к 200—500 мг гомогената три объема воды (до 1,5 см^3). Выдерживают при комнатной температуре приблизительно 10 мин.

А.1.2.7.3 Методика выделения ДНК

Осторожно переносят 500 мм^3 водной фазы (суспензии) в новую пробирку. Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 12000*g*.

Надосадочную жидкость отбрасывают и повторно растворяют осадок в 500 мм^3 буфера для экстрагирования/лизиса (А.1.2.5.23).

Добавляют 50 мм^3 раствора лизоцима (А.1.2.5.20). Инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 ч. Если результаты неудовлетворительные, можно добавить к лизоциму 10 ед. мутанолизина (А.1.2.5.19). Однако перед систематическим применением необходимо проверить специфичное для продукта воздействие этой добавки.

Добавляют 25 мм^3 раствора SDS (А.1.2.5.24) и 25 мм^3 раствора протеиназы-К (А.1.2.5.25), затем инкубируют в течение 10 мин при температуре 60 °С.

Добавляют один объем смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.2.5.18) и перемешивают.

Центрифугируют смесь в течение 3 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку.

Добавляют один объем смеси хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.2.5.17) и перемешивают.

Центрифугируют смесь в течение 3 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Переносят верхнюю фазу в новую пробирку.

Добавляют 0,1 объема раствора ацетата натрия (А.1.2.5.27) и один объем изопропанола (А.1.2.5.1). Осторожно перемешивают несколько раз путем переворачивания пробирки.

Выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин. Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Надосадочную жидкость удаляют.

Осадок после центрифугирования тщательно промывают не менее 500 мм^3 раствора этилового спирта (А.1.2.5.26), осторожно перемешивают, несколько раз переворачивая пробирку. Центрифугируют смесь в течение 10 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Эта стадия является особенно важной для удаления осаждающихся солей, которые могут оказать влияние на последующий анализ (например, ПЦР).

Надосадочную жидкость отбрасывают.

Осадок после центрифугирования высушивают и повторно растворяют его в 100 мм^3 воды или соответствующего буфера, например буфера ТЕ (А.1.2.5.28). Полученный раствор является основным раствором ДНК.

А.1.2.8 Перечень примеров

См. таблицу А.1.

Таблица А.1 — Перечень продуктов, к которым был успешно применен данный метод

Успешно проанализированный продукт	Микроорганизм	Ссылка
Колбаса, подвергнутая ферментации	*Lactobacillus curvatus*	[6]
«Летняя колбаса» (обработанная термически)	*Lactobacillus curvatus*	[7]
Сливки	*Staphylococcus aureus*	[8]

А.1.2.9 Эффективность применения метода

Данные по эффективности применения, приведенные в таблице А.2, были получены в результате совместного исследования, выполненного рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевых продуктов, полученных с использованием способов генной инженерии» Комиссии Федерального управления по охране здоровья Германии для внедрения методов согласно статье 35 закона Германии о пищевых продуктах [6].

При проведении этого исследования два образца дали ложноположительные результаты, вызванные, возможно, недостатками упаковки. Для данного исследования мутанолизин не использовался.

Таблица А.2 — Данные эффективности применения метода

Количество участвующих лабораторий	Количество образцов колбасы на лабораторию	Общее количество образцов	Количество корректно идентифицированных образцов
15	10	150	148

А.1.3 Метод на основе фенола/хлороформа. Процедура для заквасочных культур йогурта

А.1.3.1 Общие положения

Настоящий метод описывает процедуру экстрагирования основной массы ДНК из заквасочных культур, используемых для ферментации йогурта из молочных продуктов. Эта методика успешно применяется для обычных йогуртов, включая йогурты, содержащие различные ингредиенты, такие как фрукты, добавки и стабилизаторы, а также для продуктов с различным содержанием жира (см. А.1.3.8 и [9]—[11]). Из йогуртов, подвергнутых термической обработке [12], также экстрагируется ДНК, пригодная для ПЦР.

А.1.3.2 Статус валидации

Этот метод был проверен при межлабораторном исследовании (см. А.1.3.9).

А.1.3.3 Принцип метода

Этот метод основывается на способе выделения ДНК с помощью фенола/ хлороформа, который адаптирован к специальному пищевому продукту. Грамположительные заквасочные культуры йогуртов концентрируются после расщепления коагулированного казеина при щелочном pH. Выделенные клетки повторно суспендируют в буферном водном растворе и обрабатывают лизоцимом (и мутанолизином) для расщепления клеточных оболочек. Лизис клеток происходит при добавлении ионного детергента, такого как додецилсульфат натрия (SDS). Белки удаляют путем обработки протеиназой-К, а затем экстрагируют смесью фенол — хлороформ и хлороформом в несколько стадий. Последней стадией является осаждение ДНК этиловым спиртом.

А.1.3.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.1.3.5 Реактивы

А.1.3.5.1 Изопропанол [$CH_3CH(OH)CH_3$].

А.1.3.5.2 Этиловый спирт, C_2H_5OH, 96 %-ный

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.3.5.3 Ледяная уксусная кислота, CH_3COOH.

А.1.3.5.4 Хлорид натрия, NaCl.

А.1.3.5.5 Цитрат натрия, $C_6H_5Na_3O_7$.

А.1.3.5.6 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.1.3.5.7 Гидроксид натрия, NaOH.

А.1.3.5.8 Изоамиловый спирт [$(CH_3)_2CHCH_2CH_2(OH)$].

А.1.3.5.9 Фенол, C_6H_5OH.

А.1.3.5.10 Хлороформ, $CHCl_3$.

А.1.3.5.11 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.1.3.5.12 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.1.3.5.13 Додецилсульфат натрия (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

А.1.3.5.14 Лизоцим, 50000 ед./мг белка (1 ед. будет давать ΔA_{450} = 0,001 в минуту при 6,24 ед pH и температуре 25 °С, используя суспензию *Micrococcus lysodeikticus* в качестве субстрата, в 2,6 $см^3$ реакционной смеси при оптической длине пути 1 см).

А.1.3.5.15 Сахароза, $C_{12}H_{22}O_{11}$.

А.1.3.5.16 Протеиназа-К, приблизительно 20 ед./мг лиофилизата.

А.1.3.5.17 Ацетат натрия, $C_2H_3O_2Na$.

А.1.3.5.18 Раствор цитрата натрия, $C_6H_5Na_3O_7$, 400 г/$дм^3$.

А.1.3.5.19 Раствор гидроксида натрия, NaOH, 0,4 моль/$дм^3$

Растворяют в стерильной воде. Автоклавирование не допускается. Перед использованием готовят свежий раствор.

А.1.3.5.20 Раствор хлорида натрия/цитрата натрия (SSC 5×, концентрированный 5-кратный основной раствор), (NaCl), 0,75 моль/$дм^3$, ($C_6H_5Na_3O_7$), 0,075 моль/$дм^3$.

Целесообразно готовить концентрированный основной раствор SSC 20× (например, 20-кратный основной раствор, так как растворы с высокой концентрацией солей обычно более устойчивы). Разбавляют перед использованием.

А.1.3.5.21 Уравновешенный фенол

Используется фенол со значением 8,0 ед. pH и уравновешенный буфером Трис/HCl (> 7,8 ед. pH) или, например, приготовленный в соответствии с [5] или рекомендациями изготовителя.

А.1.3.5.22 Смесь хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают 24 объемные части хлороформа (А.1.3.5.10) и одну объемную часть изоамилового спирта (А.1.3.5.8).

А.1.3.5.23 Смесь фенол — хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают 25 объемных частей насыщенного фенола (А.1.3.5.21) с 24 объемными частями хлороформа (А.1.3.5.10) и одной объемной частью изоамилового спирта (А.1.3.5.8).

А.1.3.5.24 Раствор мутанолизина в стерильной воде, содержащий 500 или 5000 ед./$см^3$ мутанолизина

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.3.5.25 Раствор лизоцима в стерильной воде, содержащий 10 мг/$см^3$ лизоцима

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания

А.1.3.5.26 Раствор сахарозы, $C_{12}H_{22}O_{11}$, 400 г/$дм^3$.

А.1.3.5.27 Буферный раствор А, (Трис), 0,020 моль/$дм^3$, (Na_2ЭДТА), 0,020 моль/$дм^3$, (NaCl), 0,100 моль/$дм^3$

Доводят значение до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.1.3.5.28 Буфер для экстрагирования/лизиса, содержащий 1 объемную часть буферного раствора А (А.1.3.5.27) и одну объемную часть раствора сахарозы (А.1.3.5.26).

А.1.3.5.29 Раствор SDS, (SDS), 250 г/$дм^3$.

А.1.3.5.30 Раствор протеиназы-К в стерильной воде, 20 мг/$см^3$

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.3.5.31 Раствор этилового спирта, (C_2H_5OH), 70 %-ный

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.3.5.32 Раствор ацетата натрия, ($C_2H_3O_2Na$), 3 моль/$дм^3$

Доводят значение pH до 5,2 ед. pH ледяной уксусной кислотой.

А.1.3.5.33 Буфер ТЕ, (Трис), 0,010 моль/$дм^3$, (Na_2ЭДТА), 0,001 моль/$дм^3$

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.1.3.6 Оборудование

Применяется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.1.3.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение не менее 12000*g*. На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.1.3.6.2 Водяная баня или инкубатор.

А.1.3.6.3 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.1.3.6.4 Смеситель, например, Vortex®.

А.1.3.7 Методика

А.1.3.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления навески анализируемой пробы из исследуемого продукта необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК.

При изменении размера пробы требуется соответственно масштабировать массы реактивов и объемы буферов.

А.1.3.7.2 Методика экстракции ДНК

Йогурт хорошо встряхивают или перемешивают. Переносят 250 мм^3 йогурта в пробирку вместимостью 2 см^3. Добавляют 80 мм^3 раствора цитрата натрия (А.1.3.5.18). Добавляют 150 мм^3 раствора NaOH (А.1.3.5.19) и хорошо перемешивают. Центрифугируют при ускорении 12000*g* в течение 2 мин.

Осадок после центрифугирования должен иметь диаметр не более 0,7 см и занимать объем не более 100 мм^3. В противном случае указанные стадии (добавление 80 мм^3 раствора цитрата натрия и 150 мм^3 раствора NaOH) необходимо повторить.

Отбрасывают верхний слой жира и образовавшийся верхний водный слой и осадок после центрифугирования повторно суспендируют в 500 мм^3 раствора SSC 5× (А.1.3.5.20). Центрифугируют не менее 2 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают. Повторно суспендируют осадок после центрифугирования в 500 мм^3 раствора SSC 5×. Центрифугируют в течение 2 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают.

Осадок после центрифугирования повторно суспендируют в 500 мм^3 буфера для экстрагирования/лизиса (А.1.3.5.28). Добавляют 50 мм^3 раствора лизоцима (А.1.3.5.25). Инкубируют при температуре 37 °С в течение 1 ч. Если результаты неудовлетворительные, к раствору лизоцима может быть добавлено 10 ед. мутанолизина (А.1.3.5.24). Однако перед систематическим применением необходимо проверить воздействие этой добавки для соответствующего продукта.

Добавляют 25 мм^3 раствора SDS (А.1.3.5.29) и 25 мм^3 раствора протеиназы-К (А.1.3.5.30). Инкубируют в течение 10 мин при температуре 60 °С. Добавляют 500 мм^3 смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.3.5.23) и перемешивают. Центрифугируют в течение 3 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Переносят верхнюю водную фазу в новую пробирку. Добавляют один объем смеси хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.3.5.22) и перемешивают. Центрифугируют в течение 3 мин при ускорении приблизительно 12000*g*.

Переносят верхнюю фазу в новую пробирку. Добавляют 0,1 объема раствора ацетата натрия (А.1.3.5.32) и один объем изопропанола (А.1.3.5.1). Выдерживают при комнатной температуре не менее 30 мин. Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают. Тщательно промывают осадок после центрифугирования не менее 500 мм^3 раствора этилового спирта (А.1.3.5.31). Центрифугируют смесь в течение 10 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Эта стадия является очень важной для удаления осаждающихся солей, которые могут оказывать влияние на последующий анализ (например, ПЦР).

Надосадочную жидкость отбрасывают.

Осадок после центрифугирования высушивают и повторно растворяют его в 100 мм^3 воды или соответствующего буфера, например буфера ТЕ (А.1.3.5.33). Полученный раствор является основным раствором ДНК.

А.1.3.8 Перечень примеров

См. таблицу А.3.

Таблица А.3 — Перечень продуктов, к которым был успешно применен описанный метод

Успешно проанализированный продукт	Содержание, добавки и т. д.	Микроорганизм	Ссылка
Обычный йогурт	0,3 % жира, 3,5 % жира	*Streptococcus thermophilus*	[9], [11]
Фруктовые йогурты	1,5 % жира, модифицированный крахмал, лесной орех, желатин 1,5 % жира, 3,8 % белка, аспартам, ацесульфам, ананас 3,5 % жира, ароматизатор, желатин, персик, кокосовый орех 10 % жира, модифицированный крахмал, лимон, ароматизатор, миндаль, пектин, каротин, рибофлавин	*Streptococcus thermophilus*	[9]
Обычный йогурт, подвергнутый термообработке	3,5 % жира	*Streptococcus thermophilus*	[12]

А.1.3.9 Эффективность применения метода

Данные по эффективности применения методики, приведенные в таблице А.4, были получены в результате совместного исследования, выполненного рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевых продуктов, полученных с использованием способов генной инженерии» Комиссии Федерального управления по охране здоровья Германии для внедрения методов согласно статье 35 закона Германии о пищевых продуктах [11].

При проведении этого исследования две лаборатории не выполнили проверку гибридизацией. Для данного исследования мутанолизин не использовался.

Таблица А.4 — Данные по эффективности применения метода

Количество участвующих лабораторий	Количество образцов йогурта на лабораторию	Общее количество образцов	Количество корректно идентифицированных образцов
20	10	200	200 (99 контрольных образцов и 101 образец с ГМО)

А.1.4 Метод на основе фенола/хлороформа. Процедура для дрожжей и/или гифомицетов, собранных с пищевых продуктов

А.1.4.1 Общие положения

Данный метод описывает одноступенчатое выделение и очистку ДНК, пригодной для ПЦР, из дрожжей, гифомицетов [13] или выделенных микробных популяций. Метод применим для выделения ДНК из генетически модифицированных микроорганизмов в продуктах очень сложного состава [14], [15]. Метод может использоваться для выделения общей ДНК из продукта [14], [15] или из микробной фракции, которая непосредственно выделена из продукта либо собрана из заквасочных культур (колонии на жидких или агаровых средах).

Примечание — Предварительное выделение микробной фракции из образца для анализа дает наиболее достоверные результаты при выделении ДНК.

Общую ДНК из продукта выделяют с помощью альтернативных методов, приведенных в приложении А. Однако эти методы не гарантируют, что достаточное количество ДНК будет выделено из всех микроорганизмов (особенно из грибов, устойчивых к лизису, или грамотрицательных бактерий). Данный метод может использоваться для выделения общей ДНК из таких продуктов, как йогурт, молоко или сыр. Однако достоверное хорошее выделение ДНК обеспечивается только для тонкоизмельченных или размолотых твердых продуктов. В силу этого перед применением метода его эффективность необходимо всегда проверять на ДНК основного исследуемого продукта.

А.1.4.2 Статус валидации

Этот метод выделения ДНК был применен и проверен [13] на представителях 25 родов грибов, представляющих 325 видов (включая дрожжи, используемые в хлебопекарном производстве или виноделии, и *Penicillia spp.* [16], используемые производителями голубого сыра), в форме мицелия и спор (среди которых виды, наиболее устойчивые к лизису, например *Aspergillus fumigatus* и *Cryptococcus neoformans*). Данный метод был разработан таким образом, чтобы избежать лабораторного загрязнения и загрязнения между пробами. Такое свойство метода позволяет применять его для проведения систематического выделения ДНК и в больших объемах и применения ее для ПЦР. При применении метода не было обнаружено изменений качества матрицы ДНК при качественной ПЦР после долгосрочного хранения при температуре минус 20 °С в течение по крайней мере пяти лет или вариаций между различными препаратами ДНК из одного и того же организма. Несмотря на то, что качество выделенной данным методом ДНК подходит для качественной ПЦР, она может подвергаться недостаточному расщеплению в процессе рестрикционного анализа. Однако для использования ДНК, полученной данным методом, для количественной ПЦР необходимо выполнить процедуру ее дополнительной очистки с применением другого метода, например такого, который описан в А.4.

А.1.4.3 Принцип метода

Как правило, бактерии, дрожжи или мицелий разрушаются при перемешивании с высокой скоростью в присутствии стеклянных шариков в смеси Трис — фенол — хлороформ — ЭДТА — SDS, а затем ДНК осаждается этиловым спиртом.

А.1.4.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.1.4.5 Реактивы

А.1.4.5.1 Этиловый спирт, C_2H_5OH, 96 %-ный

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.4.5.2 Ледяная уксусная кислота, CH_3COOH.

А.1.4.5.3 Серная кислота, H_2SO_4, > 90 %.

А.1.4.5.4 Бикарбонат калия, $KHCO_3$.

А.1.4.5.5 Ацетат калия, $C_2H_3O_2K$.

А.1.4.5.6 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.1.4.5.7 Изоамиловый спирт [$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$].

А.1.4.5.8 Фенол, C_6H_5OH.

А.1.4.5.9 Хлороформ, $CHCl_3$.

А.1.4.5.10 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.1.4.5.11 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.1.4.5.12 Гидроксид калия, KOH.

А.1.4.5.13 Додецилсульфат натрия (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

А.1.4.5.14 Рибонуклеаза-А, выделенная из бычьей поджелудочной железы, свободная от дезоксирибонуклеазы, приблизительно 50 ед./мг лиофилизата.

А.1.4.5.15 Уравновешенный фенол, > 7,8 ед. pH

Используют фенол (А.1.4.5.8), приготовленный в соответствии с [5] или (по выбору) полностью уравновешенный буфером для экстрагирования (А.1.4.5.18) без SDS или в соответствии с рекомендациями изготовителя.

А.1.4.5.16 Смесь хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают 24 объемные части хлороформа (А.1.4.5.9) с одной объемной частью изоамилового спирта (А.1.4.5.7).

А.1.4.5.17 Смесь фенол — хлороформ — изоамиловый спирт

Смешивают одну объемную часть насыщенного фенола (А.1.4.5.15) с одной объемной частью смеси хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.4.5.16).

А.1.4.5.18 Буфер для экстрагирования/лизиса, (Трис) = 0,050 моль/дм^3, (K_2ЭДТА) = 0,050 моль/дм^3, (SDS) = 30 г/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.1.4.5.19 Буфер ТЕ, (Трис) = 0,010 моль/дм^3, (K_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.1.4.5.20 Раствор рибонуклеазы-А, = 10 мг/см^3 лиофилизата.

Следует хранить при температуре минус 20 °С.

А.1.4.5.21 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.4.5.22 Раствор ацетата калия, ($C_2H_3O_2K$) = 3 моль/дм^3

Доводят значение pH до 5,2 ед. pH ледяной уксусной кислотой. Автоклавирование не допускается. При необходимости пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

А.1.4.5.23 Кондиционированные стеклянные шарики

Стеклянные шарики диаметром 0,2—0,5 мм выдерживают в течение ночи в концентрированной серной кислоте (А.1.4.5.3). Промывают их стерильной водой, кипятят в растворе $KHCO_3$ (А.1.4.5.24), снова промывают стерильной водой и высушивают при температуре 80 °С в вакууме [13], [14].

А.1.4.5.24 Раствор бикарбоната калия, ($KHCO_3$) = 50 г/дм^3

Используют свежеприготовленный водный раствор.

А.1.4.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.1.4.6.1 Встряхиватель для полиэтиленовых микропробирок вместимостью 2 см^3 с навинчивающимися колпачками. Скорость встряхивания — не менее 100 встряхиваний/мин (например, Mini-BeadBeater$^{TM1)}$).

А.1.4.6.2 Микропробирки, полиэтиленовые пробирки вместимостью 2 см^3 с кольцевым уплотнением и навинчивающимися колпачками.

А.1.4.6.3 Устройство для фильтрования, фильтры из стекловолокна диаметром 25 мм.

А.1.4.6.4 Центрифуга с ускорением как минимум 10000 g, с ротором, способным удерживать микропробирки вместимостью 2 см^3.

На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.1.4.6.5 Водяная баня или инкубатор.

А.1.4.6.6 Вакуумная сушилка (при необходимости). Рекомендуется для приготовления стеклянных шариков (А.1.4.5.23).

А.1.4.6.7 Смеситель, например, Vortex®.

А.1.4.7 Методика

А.1.4.7.1 Приготовление анализируемой пробы и микробной фракции

Методы выделения микробных фракций, использующие этап обогащения, могут быть приведены в нормативных правовых актах по микробиологическому контролю пищевой продукции. Микробная фракция, полученная после этапа обогащения, может быть использована для выделения ДНК.

Исходя из анализируемой пробы объемом 1—2 см^3 выделяют микробиологическую популяцию соответствующим образом (см. А.1.3). В качестве альтернативы дрожжи или гифомицеты, выделенные из навески образца,

---

[1)] Mini-BeadBeater — это пример коммерчески доступного оборудования Biospec products, пригодного для использования с описываемым методом. Эта информация приводится исключительно для информации пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением конкретного типа оборудования. Допускается использование аналогичного оборудования, при условии, что оно позволяет получать такие же результаты.

могут культивироваться как заквасочные культуры. В обоих случаях микроорганизмы собираются и подвергаются дальнейшей обработке в соответствии с А.1.4.7.2 или хранятся при температуре минус 20 °С до начала обработки.

А.1.4.7.2 Выделение ДНК

А.1.4.7.2.1 Мицелий, собранный на фильтре из стекловолокна, дважды промывают буфером для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18), не содержащим SDS. Мицелиальную пленку снимают с фильтра и переносят ее в микропробирку вместимостью 2 $см^3$ с навинчивающимся колпачком (А.1.4.6.2), содержащую 600 $мм^3$ буфера для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18) и 600 $мм^3$ смеси фенол — хлороформ — изоамиловый спирт (А.1.4.5.17) и наполовину заполненную кондиционированными стеклянными шариками (А.1.4.5.23). Дальнейшая обработка описана в А.1.4.7.2.3.

А.1.4.7.2.2 С осадками после центрифугирования либо общей микробной популяции, бактерий, мицелия, дрожжей, либо дрожжеподобных микроорганизмов необходимо выполнить следующие процедуры. Клетки промывают один раз 1 $см^3$ буфера для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18), не содержащего SDS, центрифугируют при ускорении от 10000*g* до 13000*g* в течение 10 мин, повторяют по меньшей мере еще один раз, затем повторно растворяют в 600 $мм^3$ буфера для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18) и переносят в микропробирку, содержащую стеклянные шарики и смесь фенол–хлороформ, как указано в А.1.4.7.2.1.

А.1.4.7.2.3 После стадии А.1.4.7.2.1 или А.1.4.7.2.2 содержимое микропробирки перемешивают на встряхивателе (А.1.4.6.1) со скоростью не менее 100 встряхиваний/мин в течение 1—2 мин, затем немедленно инкубируют при температуре 65 °С в течение от 30 до 120 мин. Центрифугируют при ускорении от 10000 до 13000 *g* в течение 10 мин. Переносят образовавшийся верхний слой в новую микропробирку.

В случае применения ДНК для дальнейшей количественной ПЦР необходимо выполнить следующие процедуры. После 30 мин инкубирования содержимое микропробирки центрифугируют при ускорении от 10000*g* до 13000*g* в течение 15 мин. Переносят образовавшийся верхний слой в новую микропробирку. Добавляют рибонуклеазу-А (А.1.4.5.20) до конечной массовой концентрации 0,001 $мг/см^3$ и инкубируют еще в течение 30—90 мин при температуре 65 °С.

Добавляют раствор ацетата калия (А.1.4.5.22) до конечной молярной концентрации 0,3 $моль/дм^3$. Перемешивают, добавляют 1,2 $см^3$ этилового спирта (А.1.4.5.1) и инкубируют в течение ночи при температуре минус 20 °С или в течение 1 ч при температуре минус 80 °С. ДНК осаждают центрифугированием при ускорении от 10000*g* до 13000*g* в течение 15 мин при температуре минус 4 °С.

После центрифугирования осадок ДНК осторожно промывают раствором этилового спирта (А.1.4.5.21). Сливают образовавшийся сверху слой на бумагу и высушивают содержимое микропробирки в вакууме. ДНК растворяют в 50—100 $мм^3$ воды. Допускается длительное (до пяти лет) хранение при температуре минус 20 °С. На основании проведенных проверок [13] допускается использование воды вместо буфера ТЕ (А.1.4.5.19). Полученный раствор является основным раствором ДНК.

А.1.4.8 Перечень примеров

Количество исследованных видов/штаммов указывается в скобках:

Absidia corymbifera (1), Acremonium spp. (2), Aspergillus spp. (119), Candida spp. (7), Cladosporium spp. (2), Cryptococcus spp. (6), Epidermophyton floccosum (1), Fusarium solani (1), Malbranchea pulchella (1), Geotrichum spp. (2), Microsporum canis (1), Paecilomyces spp. (2), Penicillium spp. (20), Pityrosporum ovale (1), Rhizopus spp. (2), Saccharomyces cerevisiae (1), Schizosaccharomyces pombe (1), Scopu-lariopsis brevicaulis (1), Trichoderma spp. (124), Trichophyton spp. (2), Trichosporon spp. (2), Ulocladium botrytis (1), Verticillium tenerum (1).

А.1.4.9 Эффективность применения метода

Эффективность метода проверялась в отношении грибов [13]. При количественном анализе эффективности выделения было установлено, что использование дробления с помощью стеклянных шариков было наиболее эффективным [18].

А.2 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе поливинилпирролидона (ПВП)

А.2.1 Основной метод на основе ПВП

А.2.1.1 Общие положения

Этот простой, быстрый и дешевый метод [19] пригоден для большой группы продуктов, особенно содержащих большие количества полифенольных соединений.

А.2.1.2 Статус валидации

Этот метод был проверен путем внутрилабораторных исследований и применяется для систематического выделения ДНК во многих лабораториях. Данный метод еще не оценивался путем официальных межлабораторных исследований.

А.2.1.3 Принцип

Метод включает стадию лизиса (термический лизис в присутствии додецилсульфата натрия и высокой концентрации ЭДТА) и последующее удаление из водной фазы, содержащей ДНК, загрязняющих примесей, например полифенольных молекул, полисахаридов, метаболитов и растворимых белков, с помощью ПВП в комбинации с ацетатом аммония. Последним этапом является осаждение ДНК этанолом, что концентрирует ДНК и очищает ее от солей (см. [19]—[23]).

А.2.1.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.2.1.5 Реактивы

А.2.1.5.1 Этиловый спирт, C_2H_5OH, 96 %-ный.

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.2.1.5.2 Изопропанол, $CH_3CHOHCH_3$.

А.2.1.5.3 Поливинилпирролидон (ПВП), молекулярная масса M = 360 кДа; характеристическая вязкость (значение К) = 80—100[1)].

А.2.1.5.4 Ледяная уксусная кислота, CH_3COOH.

А.2.1.5.5 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.2.1.5.6 Хлорид натрия, NaCl.

А.2.1.5.7 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.2.1.5.8 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.2.1.5.9 Додецилсульфат натрия (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

А.2.1.5.10 Ацетат аммония, $C_2H_3O_2NH_4$.

А.2.1.5.11 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный.

Следует хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.2.1.5.12 Буфер для экстрагирования, pH = 8,0 ед., (Трис) = 0,2 моль/дм^3, (NaCl) = 0,250 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = = 0,025 моль/дм^3, (SDS) = 50 г/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH , используя HCl или NaOH.

А.2.1.5.13 Раствор ацетата аммония, ($NH_4C_2H_3O_2$) = 7.5 моль/дм^3.

Растворяют в стерильной воде. При необходимости пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

А.2.1.5.14 Буфер ТЕ, (Трис) = 0,010 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.2.1.6 Оборудование

Необходимо использовать обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.2.1.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение 10000 *g*.

На некоторых этапах необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.2.1.6.2 Водяная баня или инкубатор.

А.2.1.6.3 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.2.1.6.4 Сублимационная сушилка (при необходимости).

А.2.1.6.5 Смеситель, например Vortex®.

А.2.1.7 Методика

А.2.1.7.1 Сразу после приготовления навески образца из исследуемого продукта (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК. При изменении размера навески образца требуется соответственно масштабировать массы реактивов и объемы буферов.

А.2.1.7.2 Методика выделения ДНК

Взвешивают 0,25 г измельченного или жидкого материала в пробирке. Добавляют 1 см^3 буфера для экстрагирования (А.2.1.5.12). Перемешивают суспензию при температуре 65 °С в течение 1 ч, охлаждают до комнатной температуры. Последовательно смешивают суспензию с 60 мг порошка ПВП (А.2.1.5.3) и 0,5 объема раствора ацетата аммония (А.2.1.5.13). Инкубируют на льду в течение 30 мин.

Центрифугируют при ускорении 10000*g* в течение 10 мин и переносят надосадочную жидкость в чистую пробирку. Смешивают верхний слой с одним объемом изопропанола (А.2.1.5.2) и инкубируют при температуре минус 20 °С в течение 30 мин. Центрифугируют при ускорении 10000*g* и температуре 4 °С в течение 10 мин и надосадочную жидкость осторожно отбрасывают.

Промывают осадок ДНК в пробирке после центрифугирования двумя объемами раствора этилового спирта (А.2.1.5.11). Этот этап является важным для удаления любых солей, которые могут оказывать влияние на последующий анализ (например, ПЦР). Надосадочную жидкость осторожно отбрасывают (в случае рыхлого осадка центрифугируют при ускорении 10000*g* и температуре 4 °С в течение 10 мин). Осадок высушивают и повторно растворяют его в 100 мм^3 воды или соответствующего буфера, например буфера ТЕ (А.2.1.5.14). Полученный раствор является основным раствором ДНК.

[1)] SIGMA P-5288 — пример подходящего реактива, имеющегося в продаже. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Могут использоваться эквивалентные реактивы, если их применение приводит к тем же результатам.

А.2.1.8 Перечень примеров

Метод был успешно применен для выделения ДНК[1)] из следующих продуктов: детское печенье[1)], детское молоко[1)], бельгийский паштет, панировка (пшеничная или кукурузная) рыбных палочек, шоколадное пирожное с орехами[1)], консервированная кукуруза, брикетированный зерновой концентрат[1)], сырный крокет, нугат с курицей, курица, печенье, глазированное шоколадом[1)], шоколадная паста[1)], кукурузные хлопья[1)], хрустящие овощи, десертный крем[1)], композиции для вскармливания детей, кукурузное печенье[1)], кукурузная мука, мясо свежее и подвергнутое тепловой обработке (говядина, свинина, курица и индейка), рубленое мясо, мюсли[1)], воздушная кукуруза, сухое молоко, колбаса (реализуемая в ломтиках[1)] и коктейльные сосиски[1)]), шницель, побеги сои[1)], суповые шарики, соевый белок в мясных препаратах[1)], соевый лецитин[1)], соевые напитки[1)], соевый крем, соус для спагетти[1)], фигурное печенье, соевый творог, вегетарианский рубленый шницель, вафли с шоколадом[1)], вафли[1)], йогурт[1)].

А.3 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе ЦТАБ

А.3.1 Основной метод на основе ЦТАБ

А.3.1.1 Общие положения

Этот метод применим для экстракции ДНК из растений и из продуктов, полученных из растений, так как он позволяет удалять полисахариды и полифенольные соединения, которые могут оказывать негативное влияние на качество выделяемой ДНК. Метод также пригоден и для некоторых других продуктов (см. А.3.1.8).

А.3.1.2 Статус валидации

Этот метод был проверен путем кольцевого тестирования (см. А.3.1.9).

Этот метод широко используется во многих лабораториях для систематического выделения ДНК.

А.3.1.3 Принцип

Метод включает стадию лизиса (термический лизис в присутствии ЦТАБ) и следующие за ней несколько стадий для удаления загрязняющих примесей, например полисахаридов и белков [24].

Для некоторых продуктов рекомендуется использовать различные ферменты, как указано в А.3.1.7. α-амилаза добавляется к буферу для лизиса, чтобы разрушить крахмал в случае продуктов, содержащих амилозу. Для большинства продуктов необходима обработка образцов протеиназой-К для удаления белков. Как правило, рекомендуется обработка рибонуклеазой тех продуктов, для которых соосаждение рибонуклеиновой кислоты может создавать трудности для последующего анализа.

Концентрация солей во время проведения стадий выделения — важный параметр для удаления загрязняющих примесей. В случае понижения концентрации солей ниже 0,5 моль/дм^3 при комнатной температуре и/или снижения температуры ниже 16 °С будет образовываться осадок — ЦТАБ-нуклеиновая кислота. Очистки от денатурированных белков и полисахаридов, образующих комплексные соединения с ЦТАБ, можно добиться повышением концентрации солей (например, путем добавления хлорида натрия), в то время как нуклеиновые кислоты становятся при этом растворимыми. Для дальнейшей очистки нуклеиновых кислот от ЦТАБ и комплексов полисахарид/белок используется хлороформ.

Окончательно нуклеиновые кислоты очищают путем осаждения изопропанолом и промывки этиловым спиртом.

А.3.1.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.3.1.5 Реактивы

А.3.1.5.1 α-амилаза (при необходимости) типа IIa, из видов *Bacillus*, 1500—3000 ед./мг белка.

А.3.1.5.2 Хлороформ, $CHCl_3$.

А.3.1.5.3 Этиловый спирт, C_2H_5OH, 96 %-ный.

А.3.1.5.4 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.3.1.5.5 Гексадецилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ), $C_{19}H_{42}BrN$.

А.3.1.5.6 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.3.1.5.7 Изопропанол [$CH_3CH(OH)CH_3$].

А.3.1.5.8 Протеиназа-К (при необходимости), приблизительно 20 ед./мг лиофилизата.

А.3.1.5.9 Рибонуклеаза-А, выделенная из бычьей поджелудочной железы, свободная от дезоксирибонуклеазы (при необходимости), приблизительно 50 ед./мг лиофилизата.

А.3.1.5.10 Хлорид натрия, NaCl.

А.3.1.5.11 Гидроксид натрия, NaOH.

А.3.1.5.12 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.3.1.5.13 Раствор α-амилазы (при необходимости), (α-амилаза) массовой концентрации 10 мг/см^3.

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

[1)] Повторяемость может зависеть от партии продукта и/или технологии его получения. В некоторых случаях ДНК не может быть обнаружена или она подверглась расщеплению таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода, независимо от используемых праймеров и/или протоколов ПЦР. Это может быть причиной низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

А.3.1.5.14 Буфер ЦТАБ для экстрагирования, (ЦТАБ) = 20 г/дм^3,(NaCl) = 1,4 моль/дм^3, (Трис) = 0,1 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = 0,02 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.3.1.5.15 Буфер ЦТАБ для осаждения, (ЦТАБ) = 5 г/дм^3, (NaCl) = 0,04 моль/дм^3.

А.3.1.5.16 Раствор хлорида натрия, (NaCl) молярной концентрации 1,2 моль/дм^3.

А.3.1.5.17 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный.

А.3.1.5.18 Раствор протеиназы-К в стерильной воде (при необходимости), концентрации 20 мг/см^3.

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.3.1.5.19 Раствор рибонуклеазы-А (при необходимости), массовой концентрации 10 мг/см^3.

Следует хранить в виде аликвот при температуре минус 20 °С.

А.3.1.5.20 Буфер ТЕ, (Трис) = 0,01 моль/дм^3, *с* (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.3.1.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.3.1.6.1 Инкубатор, желательно с устройством для встряхивания (шейкер-инкубатор).

А.3.1.6.2 Центрифуга, например микроцентрифуга, обеспечивающая ускорение 12000*g*.

На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.3.1.6.3 Смеситель, например Vortex®.

А.3.1.6.4 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.3.1.7 Методика

А.3.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления навески образца из исследуемого продукта необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК.

При изменении размера навески анализируемой пробы требуется соответственно масштабировать массы реактивов и объемы буферов.

А.3.1.7.2 Экстракция ДНК из анализируемой пробы

Взвешивают 200—300 мг соответствующим образом приготовленного материала в пробирке.

Добавляют 1,5 см^3 предварительно нагретого до 65 °С буфера ЦТАБ для экстрагирования (А.3.1.5.14) и перемешивают (в некоторых случаях может потребоваться большее количество буфера для растворения продукта). Добавляют 10 мм^3 раствора α-амилазы (А.3.1.5.13, при необходимости), 10 мм^3 раствора рибонуклеазы-А (А.3.1.5.19, при необходимости) и осторожно перемешивают. Инкубируют в течение 30 мин при температуре 65 °С при перемешивании. Добавляют 10 мм^3 раствора протеиназы-К (А.3.1.5.18, при необходимости), аккуратно перемешивают содержимое пробирки и инкубируют в течение 30 мин при температуре 65 °С при перемешивании (при необходимости). Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Переносят надосадочную жидкость в новую пробирку, добавляют от 0,7 до одного объема хлороформа (А.3.1.5.2) и тщательно перемешивают. Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении приблизительно 12000*g*. Переносят верхнюю (водную) фазу в новую пробирку.

А.3.1.7.3 ЦТАБ-осаждение

Добавляют два объема буфера ЦТАБ для осаждения (А.3.1.5.15). Инкубируют в течение 60 мин при комнатной температуре без перемешивания. Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении 12000*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают. Растворяют осажденную ДНК 350 мм^3 раствора NaCl (А.3.1.5.16). Добавляют 350 мм^3 хлороформа (А.3.1.5.2) и тщательно перемешивают. Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 12000*g*. Переносят водную фазу в новую пробирку.

Примечание — ЦТАБ-осаждение является необходимым не для всех продуктов, а только для тех, которые обогащены белками и полисахаридами. При обеспечении получения эквивалентных результатов возможна очистка ДНК альтернативным методом в твердой фазе (например, при использовании вращающихся колонок).

А.3.1.7.4 Осаждение ДНК

Добавляют 0,6 объема изопропанола (А.3.1.5.7), осторожно перемешивают путем переворачивания пробирки и выдерживают ее при комнатной температуре в течение 20 мин. Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении 12000*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают. Добавляют 500 мм^3 раствора этилового спирта (А.3.1.5.17) в пробирку и ее содержимое перемешивают, переворачивая несколько раз. Эта стадия является важной для обеспечения полного удаления ЦТАБ. Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 12000*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают. Осадок ДНК в пробирке после центрифугирования высушивают и повторно растворяют его в 100 мм^3 воды или соответствующего буфера, например буфера ТЕ (А.3.1.5.20). Полученный раствор является основным раствором ДНК.

А.3.1.8 Перечень примеров

Метод был успешно применен для выделения ДНК из следующих продуктов: порошкообразные продукты детского питания, продукты детского питания, смеси для хлебопекарного производства, сухое печенье, бульонные

кубики[1)], сладкие и кислые конфеты, консервированная кукуруза, крем-брюле[1)], кормовой жмых, зерно хлебных злаков (рис, пшеница, овес, рожь, гречиха, просо), плиточный шоколад[1)], шоколадный крем[1)], шоколадные конфеты[1)], печенье, глазированное шоколадом[1)], печенье, кукурузное пиво[1)], кукурузные хлопья[1)], десертный крем, декстроза[1)], начинка массы пралине, мелкие мучные кондитерские изделия, рыба[1)], рыбные палочки[1)], хлопья из цельной сои, замороженный картофель, жаренный кусочками, подливка из сока жареного мяса[1)], вареный окорок, мед[1)], кормовая мука быстрого приготовления, кукурузные початки, кукурузная мука, зародыши кукурузы[1)], кукурузный глютеновый корм, листья кукурузы, кукурузный нативный крахмал[1)], кукурузное масло (нативное)[1)], белки из кукурузы[1)], семена/зерна кукурузы, крупка из кукурузы, маргарин[1)], свежее мясо, сухое молоко, молоко, комбикорм для домашних животных, мюсли[1)], семена золотистой фасоли (маш), листья горчицы, воздушная кукуруза (необработанная), хрустящий картофель, картофельный крахмал (нативный), клубни картофеля, листья рапса, рапсовый жмых, рапсовое масло (нерафинированное/нативное)[1)], семена рапса, необработанный соевый лецитин[1)], кормовая мука, готовая к употреблению, салями (с высоким содержанием жира), соленый сухой завтрак (из зерен кукурузы), колбасы, приправы[1)], модифицированные крахмалы (некоторые типы) [1)], сквашенные сливки с луком[1)], соевая мука, зародыши сои (консервированные, замороженные), соевый белок[1)], соевые напитки[1)], семена/зерна сои, соевый творог, соя (подкисленная)[1)], листья сахарной свеклы, семена сахарной свеклы, семена подсолнечника, рыбный фарш с соей[1)], сахарная кукуруза, оболочка тако (мексиканский пирожок), тарамас (паста из икры рыб), табак, томатный кетчуп[1)], томатный концентрат[1)], томаты (плоды), кукурузные чипсы[1)], вегетарианский рубленый шницель, вафли[1)], пшеничный крахмал (нативный), йогурт[1)].

А.3.1.9 Эффективность применения метода

Данные по эффективности применения метода, приведенные в таблице А.5, были получены в результате совместного исследования, выполненного рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевых продуктов, полученных с использованием способов генной инженерии» Комиссии Федерального управления по охране здоровья Германии для внедрения методов согласно статье 35 закона Германии о пищевых продуктах (см. [25]—[27]). В качестве испытуемых матриц использовались картофель, соя и томаты.

При проведении межлабораторных испытаний масса образца составляла 100 мг. Стадия ЦТАБ-осаждения была необходима для анализа сои и соевой муки. Стадии с использованием ферментов в этих межлабораторных испытаниях не проводились.

При проведении совместных исследований сои две из участвующих лабораторий использовали сильно измененные методики, а в одной лаборатории испытание пяти образцов было прервано. Таким образом, 22 из 25 участников правильно идентифицировали все 110 проб.

При проведении межлабораторных испытаний картофеля три образца дали ложноотрицательные результаты, а один образец дал ложноположительный результат. Три образца не были оценены из-за получения неоднозначных результатов двух повторных анализов.

Таблица А.5 — Данные эффективности применения метода

Продукт	Количество участвующих лабораторий	Количество образцов на лабораторию	Общее количество образцов	Количество корректно идентифицированных образцов
Соя [25]	25	5	125	110
Картофель [26]	18	10	180	173
Томаты [27]	18	5	90	90

А.4 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе диоксида кремния

А.4.1 Основной метод на основе диоксида кремния

А.4.1.1 Общие положения

Настоящий метод пригоден для экстракции ДНК из большой группы продуктов (см. примеры в А.4.1.8). Этот метод также может применяться как метод дополнительной очистки растворов ДНК, полученных после выделения ДНК другими методами.

Метод адаптирован к опубликованной процедуре [28]. В случае пригодности метода к ДНК какого-либо продукта он имеет определенные преимущества, состоящие в том, что позволяет избегать использования очень токсичных реактивов. Кроме того, по причине отсутствия неустойчивых поверхностей раздела фаз (например, вода — хлороформ) и необходимости центрифугирования с низкой скоростью метод может быть легко адаптирован для выполнения ручных анализов высокой производительности и их автоматизации.

Настоящий метод не рекомендуется для выделения ДНК из продуктов с высоким содержанием жира.

[1)] Повторяемость может зависеть от партии продукта и/или технологии его получения. В некоторых случаях ДНК не может быть обнаружена или она подверглась расщеплению таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых праймеров и/или протоколов ПЦР. Это может быть причиной низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

А.4.1.2 Статус валидации

Этот метод прошел внутрилабораторную проверку и используется для систематических анализов во многих лабораториях. Метод не подвергался оценке путем официальных межлабораторных исследований. Принцип этого метода положен в основу множества созданных наборов и тест-систем для экстракции ДНК (см. [29]—[31]).

А.4.1.3 Принцип

Метод состоит из стадии лизиса (термический лизис в присутствии додецилсульфата натрия в буферном растворе) и последующей стадии очистки с помощью смол из диоксида кремния в присутствии разобщающего агента, вызывающего диссоциацию комплексов, гуанидина гидрохлорида. Принцип метода состоит в связывании нуклеиновых кислот диоксидом кремния при низкой водной активности в результате энтропийного эффекта [32]. Загрязняющие примеси вымывают из смолы изопропанолом, в то время как ДНК остается прикрепленной к адсорбенту. Во время заключительной стадии элюирования буферным раствором с низким содержанием соли извлекается ДНК.

А.4.1.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.4.1.5 Реактивы

А.4.1.5.1 Хлорид натрия, NaCl.

А.4.1.5.2 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.4.1.5.3 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.4.1.5.4 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.4.1.5.5 Гидроксид натрия, NaOH.

А.4.1.5.6 Додецилсульфат натрия (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

А.4.1.5.7 Протеиназа-К, приблизительно 20 ед./мг лиофилизата.

А.4.1.5.8 Гуанидин гидрохлорид, CH_5N_3-HCl.

А.4.1.5.9 Хлорид калия, KCl.

А.4.1.5.10 Гидроортофосфат натрия, Na_2HPO_4.

А.4.1.5.11 Дигидроортофосфат калия, KH_2PO_4.

А.4.1.5.12 Изопропанол [$CH_3CH(OH)CH_3$].

А.4.1.5.13 Диоксид кремния (SiO_2), диоксид кремния с гранулометрическим составом от 0,5 до 10 мкм (80 % частиц от 1 до 5 мкм)[1)].

А.4.1.5.14 Рибонуклеаза-А, свободная от дезоксирибонуклеазы, приблизительно 100 ед./мг лиофилизата.

А.4.1.5.15 Раствор протеиназы-К, концентрацией 20 мг/см^3

Растворяют фермент в стерильной воде или буфере, как описано в [34]. Автоклавирование раствора не допускается. Хранить в виде аликвот при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.4.1.5.16 Раствор I гуанидина гидрохлорида, (CH_5N_3-HCl) = 5 моль/дм^3

Автоклавируют не более 15 мин при температуре 121 °С.

А.4.1.5.17 Раствор II гуанидина гидрохлорида, (CH_5N_3-HCl) = 6 моль/дм^3.

Автоклавируют не более 15 мин при температуре 121 °С.

А.4.1.5.18 Буферный раствор PBS, (NaCl) = 0,157 моль/дм^3, (KCl) = 0,0027 моль/дм^3, (Na_2HPO_4) = = 0,010 моль/дм^3, (KH_2PO_4) = 0,0018 моль/дм^3

Доводят значение pH до 7,5 ед. pH, используя HCl.

А.4.1.5.19 Суспензия диоксида кремния

Взвешивают 5 г диоксида кремния (А.4.1.5.13) в пробирке вместимостью 50 см^3 и добавляют 50 см^3 буфера PBS (А.4.1.5.18). Хорошо перемешивают и оставляют для осаждения на 2 ч. Надосадочную жидкость удаляют путем отсасывания с помощью пипетки. Добавляют еще 50 см^3 буфера PBS, хорошо перемешивают и оставляют для осаждения на 2 ч. Образовавшуюся надосадочную жидкость удаляют. Центрифугируют в течение 2 мин при ускорении 2000 g. Надосадочную жидкость отбрасывают. После центрифугирования повторно растворяют осадок в пробирке 50 см^3 раствора II гуанидина гидрохлорида (А.4.1.5.17). Используют в течение 2—5 мес. Хорошо перемешивают перед использованием.

А.4.1.5.20 Буфер для экстрагирования TNE-SDS, (NaCl) = 0,150 моль/дм^3, (Трис) = 0,002 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = = 0,002 моль/дм^3, (SDS) = 10 г/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH, и автоклавируют перед добавлением SDS.

А.4.1.5.21 Раствор изопропанола [$CH_3CH(OH)CH_3$], 80 %-ный.

А.4.1.5.22 Буферный раствор TE, (Трис) = 0,010 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.4.1.5.23 Раствор рибонуклеазы-А массовой концентрации 10 мг/см^3

Следует хранить в виде аликвот при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

[1)] SIGMA S-5631 — пример подходящего коммерческого реактива. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательное использование только этого реактива. Могут использоваться эквивалентные реактивы, если их применение приводит к тем же результатам.

А.4.1.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.4.1.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение не менее 2000*g*.

На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.4.1.6.2 Инкубатор с рабочей температурой 60 °С.

А.4.1.6.3 Встряхиватель, который должен помещаться внутри инкубатора (шейкер-инкубатор).

А.4.1.6.4 Смеситель, например, Vortex®.

А.4.1.6.5 Пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см^3 для приготовления суспензии диоксида кремния.

А.4.1.7 Методика

А.4.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления анализируемой пробы из исследуемого продукта необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК.

При изменении размера навески пробы требуется соответственно масштабировать массы реактивов и объемы буферов.

А.4.1.7.2 Методика выделения ДНК

Взвешивают 200—300 мг размолотого или измельченного материала в пробирке. Добавляют 2 см^3 буфера для экстрагирования (А.4.1.5.20) и 20 мм^3 раствора протеиназы-К (А.4.1.5.15). Инкубируют в течение 1—5 ч при температуре 60 °С. Во время инкубирования образцы необходимо интенсивно встряхивать (приблизительно 250 встряхиваний в мин). Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении 2000*g*. Переносят 550 мм^3 образовавшегося верхнего слоя в новую пробирку.

Надосадочную жидкость обрабатывают 2 мм^3 раствора рибонуклеазы (А.4.1.5.23) в течение 5 мин при температуре 37 °С (стадию гидролиза РНК рекомендуется проводить перед стадией связывания диоксидом кремния, в противном случае гидролизованная РНК и полученные в результате нуклеотиды могут оказывать влияние на последующие измерения на ультрафиолетовом спектрометре). Добавляют 55 мм^3 раствора I гуанидина гидрохлорида (А.4.1.5.16) и 100 мм^3 суспензии диоксида кремния (А.4.1.5.19). Осторожно перемешивают несколько раз. Пробирки оставляют на лабораторном столе приблизительно на 1 мин.

Центрифугируют в течение 2 мин при ускорении приблизительно 800*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают и добавляют 500 мм^3 раствора изопропанола (А.4.1.21). Пробирки закрывают и перемешивают, желательно с помощью смесителя (А.4.1.6.4), для повторного полного растворения осадка после центрифугирования.

Центрифугируют в течение 2 мин при ускорении приблизительно 1500*g*. Надосадочную жидкость отбрасывают и осадок после центрифугирования высушивают. Добавляют 100 мм^3 буферного раствора ТЕ (А.4.1.5.22). Осторожно перемешивают для повторного растворения осадка после центрифугирования. Инкубируют при температуре 60 °С в течение 5 мин. Центрифугируют в течение 5 мин при ускорении 2000*g*. Переносят 80 % образовавшегося верхнего слоя в новую пробирку. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перенести частицы диоксида кремния, которые оказывают ингибирующее воздействие на ферменты (например, ДНК-полимеразы, эндонуклеазы).

Перенесенный слой обрабатывают 2 мм^3 раствора рибонуклеазы (А.4.1.5.23) в течение 1 ч при температуре 37 °С или в течение всей ночи при комнатной температуре. Этот раствор является основным раствором ДНК.

А.4.1.8 Перечень примеров

Метод был успешно применен для экстрагирования ДНК[1)] из следующих продуктов: зародыши кукурузы[1)], кукурузная мука, кукурузный глютеновый корм[1)], листья кукурузы, модифицированный кукурузный крахмал[1)], нативный кукурузный крахмал[1)], семена кукурузы, кукурузная крупка, белок из сои[1)], соя, листья сои, сахарная свекла (свежие корнеплоды), сахарная свекла (замороженный жом), листья сахарной свеклы.

А.5 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстракции ДНК на основе гуанидина-хлороформа

А.5.1 Основной метод на основе гуанидина-хлороформа

А.5.1.1 Общие положения

Данный метод пригоден для экстрагирования ДНК из большой группы пищевых продуктов и кормов (см. А.5.1.8). В зависимости от состава пробы в некоторых случаях может потребоваться стадия дополнительной очистки.

А.5.1.2 Статус валидации

Этот метод был проверен с применением процедуры внутрилабораторной проверки.

[1)] Повторяемость может зависеть от партии продукта и/или технологии его получения. В некоторых случаях ДНК не может быть обнаружена или она подверглась расщеплению таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых праймеров и/или протоколов ПЦР. Это может быть причиной низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

А.5.1.3 Принцип

Метод заключается в термическом и ферментативном лизисе в присутствии додецилсульфата натрия в денатурирующем буферном растворе гуанидина. В некоторых случаях в зависимости от продукта необходим дополнительный этап очистки.

Загрязняющие примеси, например липиды и белки, удаляются на стадии экстрагирования хлороформом после лизиса. Следующим этапом является осаждение ДНК изопропанолом.

А.5.1.4 Меры безопасности

Работы с органическими реактивами следует выполнять в вытяжном шкафу.

А.5.1.5 Реактивы

А.5.1.5.1 α-амилаза типа IIa, из видов *Bacillus*, 1500—5000 ед./мг лиофилизата.

А.5.1.5.2 Ледяная уксусная кислота, CH_3COOH.

А.5.1.5.3 Хлороформ, $CHCl_3$.

А.5.1.5.4 Этиловый спирт (C_2H_5OH), 96 %-ный.

А.5.1.5.5 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА), $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$.

А.5.1.5.6 Гуанидин гидрохлорид, CH_5N_3-HCl.

А.5.1.5.7 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.5.1.5.8 Изопропанол [$CH_3CH(OH)CH_3$].

А.5.1.5.9 Протеиназа-К, приблизительно 20 ед./мг лиофилизата.

А.5.1.5.10 Рибонуклеаза-А, выделенная из бычьей поджелудочной железы, свободная от дезокси-рибонуклеазы, приблизительно 50000 ед./мг лиофилизата.

А.5.1.5.11 Хлорид натрия, NaCl.

А.5.1.5.12 Додецилсульфат натрия (SDS), $C_{12}H_{25}O_4SNa$.

А.5.1.5.13 Гидроксид натрия, NaOH.

А.5.1.5.14 Трис(оксиметил) аминометан (Трис), $C_4H_{11}NO_3$.

А.5.1.5.15 Раствор α-амилазы в стерильной воде, концентрацией 10 мг/см^3

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.5.1.5.16 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный.

А.5.1.5.17 Буфер для экстрагирования, (Трис) = 0,1 моль/дм^3, (NaCl) = 0,15 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = = 0,05 моль/дм^3, (SDS) = 10 г/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.5.1.5.18 Раствор гуанидина гидрохлорида (CH_5N_3-HCl) молярной концентрации 5 моль/дм^3

После приготовления раствор автоклавируют (не более 15 мин при температуре 121 °С).

А.5.1.5.19 Раствор протеиназы-К в стерильной воде, массовой концентрации 20 мг/см^3

Автоклавирование не допускается. Следует хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.5.1.5.20 Раствор рибонуклеазы-А массовой концентрации 10 мг/см^3

Следует хранить в виде аликвот при температуре минус 20 °С.

А.5.1.5.21 Буфер ТЕ, (Трис) = 0,01 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH.

А.5.1.6 Оборудование

А.5.1.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение 8000*g*. На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.5.1.6.2 Инкубатор, желательно с устройством для встряхивания (шейкер-инкубатор).

А.5.1.6.3 Смеситель, например, Vortex®.

А.5.1.7 Методика

А.5.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления навески анализируемой пробы из исследуемого продукта необходимо выполнить описанную ниже процедуру выделения и очистки ДНК.

При изменении размера навески образца требуется соответственно масштабировать массы реактивов и объемы буферов.

А.5.1.7.2 Методика экстракции ДНК

Взвешивают 200—500 мг измельченного материала в микропробирке. Добавляют 1,6 см^3 предварительно нагретого до температуры 60 °С буфера для экстрагирования (А.5.1.5.17).

Добавляют 10 мм^3 раствора рибонуклеазы-А (А.5.1.5.20) и 10 мм^3 раствора α-амилазы (А.5.1.5.15) и осторожно перемешивают, переворачивая пробирку вручную. Инкубировать в течение 50 мин при температуре 60 °С при умеренном перемешивании. Добавляют 1/10 объема раствора гуанидина гидрохлорида (А.5.1.5.18), тщательно перемешивают с помощью смесителя (А.5.1.6.3).

Добавляют 20 мм^3 раствора протеиназы-К (А.5.1.5.19), плавно перемешивают, переворачивая пробирку вручную, и инкубируют не менее 2 ч при температуре 60 °С при умеренном перемешивании. Пробирки оставляют на лабораторном столе на 15 мин, затем центрифугируют в течение 15 мин при ускорении 8000*g*.

Переносят надосадочную жидкость в новую пробирку. Добавляют один объем хлороформа (А.5.1.5.3) и перемешивают с помощью смесителя (А.5.1.6.3). Центрифугируют в течение 15 мин при ускорении 8000*g*. Переносят надосадочную жидкость в новую пробирку. Добавляют 0,6 объема изопропанола (А.5.1.5.8), перемешивают путем переворачивания. Пробирки оставляют на льду на 50 мин.

Центрифугируют в течение 20 мин при ускорении 8000*g*. Осадок после центрифугирования промывают не менее чем 2 $см^3$ раствора этилового спирта (А.5.1.5.16) и центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 8000*g*. Эта стадия является важной для удаления любых солей, которые могут оказывать влияние на последующий анализ (например, ПЦР). Надосадочную жидкость отбрасывают. Осадок после центрифугирования высушивают и повторно растворяют в 100 $мм^3$ воды или соответствующего буфера, например буфера ТЕ (А.5.1.5.21). Этот раствор является основным раствором ДНК. Если потребуется дополнительная стадия очистки, то ее необходимо выполнять на основном растворе ДНК.

А.5.1.8 Перечень примеров

Метод был успешно применен для экстрагирования ДНК[1)] из следующих продуктов: подкисленная соя, консервированная кукуруза, кормовой жмых, плиточный шоколад[1)], десертный крем[1)], хлопья из цельной сои, початки кукурузы, кукурузная мука, зародыши кукурузы[1)], кукурузный глютеновый корм[1)], модифицированный кукурузный крахмал[1)], белки из кукурузы[1)], семена/зерна кукурузы, кукурузная крупка, нативный кукурузный крахмал[1)], семена/зерна рапса, соусы[1)], мука из сои, соевый творог, соевый лецитин (необработанный коричневый[1)] и рафинированный желтый[1)], белок из сои, семена/зерна сои, кукурузные чипсы[1)].

Данный метод непригоден для анализа проб масел, мальтодекстрина, D-глюкозы, мальтита, маннита или ксилита массой 1 г.

А.5.2 Гуанидин хлороформный метод: Протокол для соевого лецитина

А.5.2.1 Назначение, обоснованность, научное основание

Соевый лецитин часто используется во многих продуктах питания в качестве эмульгатора. Лецитин может производиться из сои как генетически модифицированной (ГМ), так и генетически неизмененной. Описанный метод можно использовать для экстракции ДНК из исследуемого образца, чтобы в последующем провести ПЦР для обнаружения генетически модифицированных последовательностей ДНК из ГМ-сои. Метод взят из [44], подобная методика была апробирована в ходе межлабораторного исследования в Швейцарии. В данном исследовании количество выделенной ДНК определялось спектрометрическим способом [35]. Дополнительную экспертизу проводил Химический и Ветеринарный институт Фрайбурга (Германия) совместно с 12 лабораториями, в ходе которой количество выделенной и в последующем амплифицированной ДНК сои было определено посредством количественного ПЦР-анализа в реальном времени. Результаты опубликованы в источнике [45].

А. 5.2.2 Область применения

Настоящий метод описывает процедуру экстракции ДНК из соевого лецитина в сыром растительном масле, полученном способом холодного прессования. Если содержание ДНК в исследуемом материале низкое, для определения количества ДНК, выделенной из анализируемой пробы, и для вычисления практического предела обнаружения, доступного при использовании ПЦР-анализа, используется ПЦР в реальном времени.

А.5.2.3 Статус валидации и критерии исполнения

А.5.2.3.1 Статус валидации

Метод, описанный в этом подпункте, был апробирован в ходе межлабораторного исследования по определению количества выделяемой и амплифицируемой ДНК сои с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Совместное исследование было выполнено в соответствии с протоколом IUPAC [46].

А.5.2.3.2 Надежность метода

Методика обычно использовалась для тестирования ГМО в испытательных и частных лабораториях в Германии и Швейцарии, на протяжении более 10 лет и ни о каких проблемах не сообщалось. Хотя специфические данные надежности (например, по модификации параметров метода) и недоступны, опыт различных лабораторий показал, что небольшая вариация условий используемой методики не сказывается на ее эффективности.

А.5.2.3.3 Внутрилабораторные испытания

Материалы, использовавшиеся в совместном межлабораторном исследовании, для оценки относительной точности метода были проверены в лаборатории, которая разработала данный метод. Для оценки точности были подготовлены пять экстракций ДНК из каждого из пяти лецитинов сои, проведены измерения с помощью ПЦР в реальном времени при воспроизводимых условиях с использованием метода, специфичного для гена лектина сои согласно ИСО 21570:2005, С.2 [41]. Результаты приведены в таблице А.6.

[1)] Повторяемость может зависеть от партии продукта и/или технологии его получения. В некоторых случаях ДНК не может быть обнаружена или она подверглась расщеплению таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых праймеров и/или протоколов ПЦР. Это может быть причиной низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

Таблица А.6 — Внутрилабораторная проверка достоверности метода выделения ДНК с пятью образцами соевого лецитина (n = 5 повторностей экстракций)

Образец лецитина, №	Среднее количество копий гена лектина	Стандартное отклонение повторяемости s_r, количество копий	Стабильность коэффициента вариации $C_{V,r}$, %
1	20464	5367	26
2	3203	620	19
3	2005	306	15
4	6978	331	5
5	14	8	61

Предварительно, до проведения межлабораторной проверки, ДНК была выделена из пяти коммерческих лецитинов сои и проверена на возможность ингибирования ПЦР. Подготовленная ДНК от каждого образца была растворена в буфере ТЕ (один объем ДНК растворяли в четырех объемах ТЕ буфера; один объем ДНК первого разбавления растворяли в четырех объемах ТЕ; один объем ДНК второго разбавления растворяли в четырех объемах ТЕ). Различие между (предполагаемым) расчетным C_t-значением неразбавленного образца ДНК, и измеренным C_t-значением каждого разбавления ДНК, были ниже 0,1, из чего следует, что ДНК свободна от ПЦР-ингибиторов.

А.5.2.3.4 Совместные межлабораторные испытания

Совместное испытание (исследование достоверности) было выполнено в 12 лабораториях [45]. Для оценки использовали пять коммерчески используемых образцов лецитинов сои. Каждая лаборатория получила 15 закодированных образцов и стандартную ДНК для калибровки. Образцы были распределены таким образом, чтобы каждый участник получил три идентичных образца каждого из пяти лецитинов сои. Для каждой лаборатории было выполнено единственное выделение ДНК из образца. Возвращенные результаты были разделены на пять различных образцов лецитина для оценки результатов совместного испытания.

Выделенные ДНК были протестированы методом ПЦР в реальном времени при амплификации последовательности ДНК гена лектина сои согласно методике ИСО 21570:2005, С.2 [41]. ДНК-стандарт для калибровки был приготовлен из соевой муки [ERM BF410a[1)]] при помощи Plant Mini Kit[2)] (Qiagen, Hilden/Germany); в начале выделение ДНК производилось с применением ЦТАБ. Концентрацию ДНК оценивали флюориметрически с использованием методики PicoGreen[2)] dsDNA [17]. Стандарты ДНК были определены как число копий (ЧК) эквивалентов гаплоидного генома в мм^3. Для удобства вычисления масса гаплоидного генома сои была принята равной 1,13 пг. Был подготовлен ряд разведений в пределах 50 000 (ЧК)/5 мм^3 до 80 (ЧК)/5 мм^3. Семь лабораторий использовали оборудование ПЦР в реальном времени производства ABI[2)] (ABI 7000, 7500, 7700), пять лаборатории использовали приборы Light Cycler[2)] (Roche) со следующими модификациями к протоколу, описанному в ИСО 21570:2005 [41]: конечный объем для ПЦР составил 20 мм^3, QuantiTect Probe PCR Master Mix[2)] (Qiagen) с праймерами GM1-F и GM1-R в концентрации 500 наномоль/дм^3 каждый и 150 наномоль/дм^3 образца GM1. Программа ПЦР в реальном времени состояла из следующих этапов: горячий старт — 900 с 95 °С, 45 циклов; денатурация ДНК — 10 с при 95 °С; отжиг праймеров — 30 с при 60 °С и элонгация — 30 с при 72 °С. Флуоресцентный сигнал включался в цепь ДНК на этапе элонгации. Температура хранения — 2 °С.

Критерий пригодности метода, а также практический предел обнаружения, LOD_{prac}, для генетически модифицированной сои был определен в соответствии с ИСО 24276. Значения (в процентах) были вычислены индивидуально для каждого образца по формуле

$$LOD_{prac} = LOD_{abs}/c_{s,\,ДНК} \cdot 100, \qquad (A.1)$$

где LOD_{abs} — предел детектирования специфического для события метода ПЦР в реальном времени, использовавшегося для количественной оценки, число копий за ПЦР;

$c_{s,\,ДНК}$ — количество амплифицируемой ДНК сои в пробе, в копиях за ПЦР, определенное посредством метода ПЦР в реальном времени, специфического для референсного гена сои.

---

1) Пример коммерческого продукта. Эта информация приводится исключительно для удобства пользователей настоящего стандарта и не может служить рекомендацией или принуждением к использованию со стороны ИСО. Допускается использование аналогичного продукта, при условии, что он позволяет получать такие же результаты.

2) Колонка и набор представляют собой пример коммерческих продуктов, подходящих для использования. Эта информация приводится исключительно для удобства пользователей настоящего стандарта и не может служить рекомендацией или принуждением к использованию со стороны ИСО. Допускается использование аналогичного продукта, при условии, что он позволяет получать такие же результаты.

Примечание — Для вычисления в таблице А.7 LOD принят как 10 копий.

Таблица А.7 суммирует результаты совместного межлабораторного испытания. В четырех из пяти образцов были получены значения LOD_{prac} ниже 0,9 % (пример для существующего законодательного порога). Для образца лецитина 2 LOD_{prac} был выше 0,9 % только в одной лаборатории, для образца лецитина 3 — в двух лабораториях. Для образца лецитина 5 все лаборатории амплифицировали меньше 80 копий гена лектина, и таким образом не удалось достичь значения LOD_{prac} 0,9 % или менее. Кроме того, были вычислены коэффициенты вариации воспроизводимости для числа копий лектина, сообщавшиеся для пяти образцов лецитина. Всего для оценки использовали данные ПЦР в реальном времени 36 экстракций ДНК на один образец лецитина сои. При расчете коэффициента вариации воспроизводимости $C_{V,R}$ не было удалено ни одного «выброса». Точность данных для образца 5 не могла быть приведена из-за низкого количества копий лектина, которое было ниже LOQ метода. Было отмечено, что данные точности отражают коэффициента вариации воспроизводимости числа копий, экстрагированных из образцов лецитина в условиях воспроизводимости межлабораторных исследований.

Таблица А.7 — Сводка результатов подтверждения правильности данных

Образец лецитина №	Среднее количество копий лектина	Коэффициент вариации воспроизводимости $C_{V,R}$, %	Средний лимит практического обнаружения LOD_{prac}	Количество лабораторий с LOD_{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 обнаруживается	> 10	0/12

А.5.2.4 Принципы и заключения

Материал из вязкого образца гомогенизируют после нагревания и экстрагируют с помощью гексана после добавления гуанидин тиосульфатного буфера. Мешающие сопутствующие вещества отделяют экстракцией хлороформом, а присутствующую в растворе РНК разрушают РНКазой А. ДНК осаждают изопропанолом в присутствии гликогена, затем промывают этиловым спиртом и растворяют в воде. Для очистки ДНК проводят гельфильтрацию (с использованием перекрестно-сшитого декстранового геля для разделения по размеру).

А.5.2.5 Термины и определения

Для целей этого подпункта применяются условия и определения, предусмотренные в ИСО 21571 [43] и ИСО 24276.

А.5.2.6 Тип и количество образца

Следует убедиться, что анализируемая проба репрезентативна для исследования лабораторной пробы. Измерения и операционные этапы, которые следует выполнить, описаны в 5.1. Материал образца должен быть максимально гомогенным.

А.5.2.7 Оценка отклонения измерений

Отклонения в данных ПЦР в реальном времени для гена лектина, определенные в ходе межлабораторных испытаний, приведены как коэффициент вариации воспроизводимости. Результаты приведены в таблице А.7.

А.5.2.8 Мешающие факторы

Степень рафинирования лецитина может влиять на способность экстракции ДНК из образцов лецитина из-за возможной деградации ДНК, сопровождающей этот технологический процесс.

А.5.2.9 Условия окружающей среды

Никакие особые условия не требуются. См. ИСО 24276.

А.5.2.10 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование.

А.5.2.10.1 Настольная центрифуга для пробирок на 1,5 или 2 $см^3$, обеспечивающая ускорение 12000*g*.

А.5.2.10.2 Центрифуга для пробирок на 50 $см^3$, обеспечивающая ускорение не менее 4000*g*.

А.5.2.10.3 Полипропиленовые центрифужные пробирки на 1,5, 2,0 и 50 $см^3$, для использования в центрифугах на 12000*g* и 4000*g*.

А.5.2.10.4 Нагревательный блок со встряхивателем[1)].

А.5.2.10.5 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.5.2.10.6 Мультимиксер, например Vortex®.

[1)] Eppendorf Thermomixer — пример подходящего коммерческого продукта. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательное использование только этого оборудования. Может использоваться эквивалентное оборудование, если его применение приводит к тем же результатам.

А.5.2.10.7 Термоциклер ПЦР в реальном времени, снабженный источником энергии, необходимым для возбуждения флуоресцентных молекул, а также оптической системой обнаружения, пригодной для обнаружения флюоресценных сигналов, генерируемых в ходе ПЦР.

А.5.2.10.8 Реакционные пробирки с крышками или колпачками, которые могут выдерживать без повреждения неоднократное нагревание до 100 °С и охлаждение до 4 °С, а также не влияющие на сигнал флюоресценции, генерируемый во время амплификации.

А.5.2.10.9 УФ-спектрофотометр или флюориметр, для определения концентрации ДНК.

А.5.2.11 Реактивы и материалы

Характеристики качества используемых реактивов см. в ИСО 24276.

А.5.2.11.1 Гуанидин тиоцианат.

А.5.2.11.2 Трис(оксиметил) аминометан (Трис) или Трис(оксиметил) аминометангидрохлорид (Трис-HCl).

А.5.2.11.3 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА).

А.5.2.11.4 Панкреатическая рибонуклеаза А.

А.5.2.11.5 Гликоген.

А.5.2.11.6 *Трет*-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля [4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль], Triton X-100[1)].

А.5.2.11.7 *н*-Гексан.

А.5.2.11.8 Хлороформ.

А.5.2.11.9 Хлорид натрия.

А.5.2.11.10 Натрия гидроксид.

А.5.2.11.11 Соляная кислота, HCl, 37 %-ная.

А.5.2.11.12 Раствор гидроксида натрия (NaOH) = 0,1 моль/дм^3. 10 г гидроксида натрия вносят в мерную колбу на 250 см^3, заполняют колбу водой до калибровочной метки.

А.5.2.11.13 Изопропанол (2-пропанол).

А.5.2.11.14 Раствор этилового спирта, C_2H_5OH, 70 %-ный. Смешивают 70 см^3 этилового спирта с 30 см^3 воды.

А.5.2.11.15 Трис-HCl буфер, 6,4 ед. pH, (Трис-HCl) = 0,1 моль/дм^3. Растворяют 1,57 г Трис-HCl в приблизительно 70 см^3 воды, доводят pH до 6,4 ед. pH соляной кислотой, переливают в мерную колбу на 100 см^3 и доводят до объема 100 см^3 водой.

А.5.2.11.16 Буфер Трис-HCl + NaCl, 7,5 ед. pH, (Трис-HCl) = 10 ммоль/дм^3, (NaCl) = 15 ммоль/дм^3. Растворяют 0,166 г Трис-HCl и 88 мг хлорида натрия приблизительно в 70 см^3 воды, доводят pH до 7,5 ед. pH используя соляную кислоту, переливают в мерную колбу на 100 см^3 и доводят до объема 100 см^3 водой.

А.5.2.11.17 Раствор ЭДТА, 8,0 ед. pH, молярной концентрации 0,5 моль/дм^3. Растворяют 18,6 г двунатриевой соли ЭДТА в приблизительно 70 см^3 воды, доводят pH до 8,0 ед. pH используя гидроксид натрия, переливают в мерную колбу на 100 см^3 и доводят до объема 100 см^3 водой.

А.5.2.11.18 Буферный раствор ТЕ, (Трис) = 0,010 моль/дм^3 и (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3.

А.5.2.11.19 Гуанидин тиоционатный буфер, (Трис-HCl) = 4,6 моль/дм^3, (Na_2ЭДТА·$2H_2O$) = 0,02 моль/дм^3, (Тритон X-100) = 11,8 г/дм^3. Смешивают 2,6 г Тритона X-100 (5.2.11.6) и 120 г гуанидин тиоционата (5.2.11.1) и растворяют в 100 см^3 Трис-HCl буфере (5.2.11.15), добавляют 8,8 см^3 раствора ЭДТА (А.5.2.11.17) и 13,2 см^3 воды. Конечный объем буфера — приблизительно 220 см^3 при ~7,2 ед. pH. Раствор может храниться при комнатной температуре в течение по крайней мере 12 мес.

А.5.2.11.20 Раствор рибонуклеазы-А, (РНКаза А) = 10 мг/см^3, в соответствии с инструкцией изготовителя или [3]. Растворяют 10 мг рибонуклеазы-А (5.2.11.4) в 1,0 см^3 буфере Трис HCl + NaCl (5.2.11.16). Нагревают раствор в течении 15 мин при 95 °С, медленно охлаждают при комнатной температуре и затем разделяют на аликвоты по 50 мм^3. Следует хранить раствор в замороженном виде, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.5.2.11.21 Раствор гликогена, (гликоген) = 20 мг/см^3. Навеску 200 мг гликогена в 15 см^3 центрифужной пробирке растворяют в 10 см^3 деионизированной воды. Аликвоты раствора можно хранить при 5 °С до 24 мес.

А.5.2.11.22 Буфер для элюирования, (0,2 ТЕ), (Трис-HCl) = 2 моль/дм^3, (ЭДТА) = 0,2 моль/дм^3, 8,0 ед. pH. Растворяют 158 мг Трис-HCl и 37 мг двунатриевой соли ЭДТА приблизительно в 400 см^3 воды; Доводят pH до 8,0 ед. pH. Переливают раствор в мерную колбу на 500 см^3 и доводят до объема водой. Раствор автоклавируют. Аликвоты раствора можно хранить при комнатной температуре в течение 12 мес.

А.5.2.11.23 Колонка MicroSpin S-300 HR для дополнительной очистки ДНК (Amersham Pharmacia Biotech)[2)]

А.5.2.11.24 Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantitation Kit для флюориметрической оценки ДНК (Invitrogen)[2)]

[1)] Пример подходящего реактива, имеющегося в продаже. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Могут использоваться эквивалентные реактивы, если их применение приводит к тем же результатам.

[2)] Колонки MicroSpin S-300 HR и набор Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantitation Kit являются примерами подходящего коммерческого продукта. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательное использование только этих приборов и реагентов. Могут использоваться эквивалентные приборы и реагенты, если их применение приводит к тем же результатам.

А.5.2.12 Отбор образцов, транспортирование, консервация и хранение

Никаких специальных требований не устанавливается.

А.5.2.13 Приготовление анализируемой пробы

Для экстракции и очистки ДНК используйте протокол, приведенный ниже. Необходима адаптация массы реактивов и объемов буферов к размеру выбранной анализируемой пробы.

Обычно лецитин или растительные масла, которые не подвергались очистке, могут быть взвешены непосредственно. Вязкие образцы лецитина перед взвешиванием необходимо предварительно нагреть до 60 °С и хорошо встряхнуть.

А.5.2.14 Калибровка инструментов

Инструменты должны быть прокалиброваны согласно ИСО/МЭК 17025 [39].

А.5.2.15 Этапы метода

А.5.2.15.1 Общая часть

Для экстракции растворителями материал вязкого образца обрабатывают гексаном и гуанидин тиоцианатным буфером. Способные помешать дальнейшему анализу вещества удаляют экстракцией хлороформом, а оставшуюся РНК разрушают РНКазой А. ДНК осаждают в присутствии гликогена изопропанолом, затем промывают раствором этилового спирта и растворяют в воде. Для удаления ингибиторов ПЦР ДНК очищают гель-фильтрацией.

А.5.2.15.2 Процедура экстракции ДНК

Убедившись, что материал образца является максимально гомогенным и помещают 2,5 г в полипропиленовую центрифужную пробирку объемом 50 см^3. Процедуру экстракции для «холостого» (контрольного) образца проводят параллельно.

Добавляют 15 см^3 *н*-гексана и растворяют лецитин. Добавляют 2 см^3 гуанидин тиоционатного буфера и тщательно смешивают раствор (например, в течение 10—20 с, используя миксер). Центрифугируют раствор в течение 10 мин при 4000 g. Большую часть верхней гексановой фазы удаляют. Нижнюю водную фазу (без осадка) перемещают в стерильную 2 см^3 полипропиленовую реакционную пробирку. Центрифугируют раствор в течение 10 мин при 10000g. Переносят 1 см^3 нижней водной фазы в стерильную 2 см^3 полипропиленовую реакционную пробирку. Добавляют 0,5 см^3 хлороформа и тщательно перемешивают раствор в течение 2 мин. Центрифугируют раствор в течение 10 мин при 10000g. Переносят от 500 до 750 мм^3 водного супернатанта в новую 1,5 см^3 полипропиленовую реакционную пробирку и добавляют 5 мм^3 раствора рибонуклеазы-А. (Стадия обработки рибонуклеазой-А, проводившаяся при межлабораторных исследованиях, при отсутствии в ней необходимости может быть пропущена. В этом случае экстракцию можно проводить с этапа добавления гликогена).

Смесь в течение 10 мин выдерживают при комнатной температуре, чтобы гидролизировать любую содержащуюся в материале РНК. Добавляют 4 мм^3 раствора гликогена и 0,8 объема изопропилового спирта (относительно используемого объема надосадочной жидкости в пробирке), осторожно перемешивают получившийся раствор и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Центрифугируют раствор в течение 10 мин при не менее чем 12000g. Всю надосадочную жидкость из пробирки сливают и осадок ДНК промывают 500 мм^3 этилового спирта. Центрифугируют раствор в течение 5 мин при не менее чем 12000 g. Спирт тщательно сливают, ДНК высушивают при комнатной температуре или в вакууме. Осадок ДНК растворяют в 50 мм^3 буфера для элюирования (например, выдерживанием в течение ночи в холодильнике; если не достигнуто полного растворения, слегка нагревают).

А.5.2.15.3 Очистка ДНК посредством гель-фильтрации

Для дополнительной очистки ДНК применяется готовая к использованию колонка для гель-фильтрации. Могут использоваться другие колонки или методы очистки, основанные на иных принципах, если они пригодны для этой цели и эквивалентным образом применяются.

Смолу в колонке Microspin S300 HR[1)] ресуспендируют, интенсивно встряхивая на Vortex®. Завинчивающуюся крышку приоткрывают, поворачивая на четверть оборота, сломав нижнюю заглушку.

Колонку Microspin S300 HR помещают в полипропиленовую реакционную пробирку на 3 см^3. Центрифугируют при 770 g в течение 1 мин. Помещают колонку Microspin S300 HR в новую полипропиленовую реакционную пробирку на 1,5 см^3 и удаляют завинчивающуюся крышку. Медленно наносят раствор ДНК (50 мм^3) на колонку. Центрифугируют при 770 g в течение 2 мин. Очищенная ДНК присутствует в элюате. Раствор ДНК должен храниться в холодильнике. Если раствор ДНК хранится одну-две недели, то температура 4 °С достаточна; для более длительных периодов хранения необходима температура минус 20 °С.

А.5.2.15.4 Количественная оценка ДНК

Если количество отчищенной ДНК образца достаточно, количественная оценка ДНК может быть проведена с использованием УФ-спектрофотометра, как описано в приложении В (раздел В.1). Концентрация ДНК также может быть оценена флюориметрически по методу PicoGreen dsDNA [17] с использованием комплекта реактивов (5.2.11.24), или эквивалентным методом.

[1)] Колонки MicroSpin S-300 HR и набор Quant-iT PicoGreen dsDNA Quantitation Kit являются примерами подходящего коммерческого продукта. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательное использование только этих приборов и реагентов. Могут использоваться эквивалентные приборы и реагенты, если их применение приводит к тем же результатам.

Так как лецитина часто содержит низкое количество ДНК, для получения пригодной для амплификации соевой ДНК предпочтительно использовать ПЦР в реальном времени (см. В.3). Метод количественной оценки гена соевого лектина описан в ИСО 21570:2005 [41].

А.5.2.15.5 Оценка целостности ДНК

Целостность ДНК, полученной при экстракции, в последующем не оценивается, поскольку критерием качества экстрагированной ДНК является ее пригодность для амплификации при последующей ПЦР с использованием специфических для сои методов для последовательностей ДНК не превышающих 100 п.о.

А.5.2.15.6 Подготовка стандартов

Контрольная ДНК для калибровки выделена из соевой муки [ERM BF410a] с использованием протокола с ЦТАБ. Концентрацию ДНК оценивали флюориметрически методом PicoGreen dsDNA [17].

А.5.2.15.7 Критерии принятия или отклонения результатов

Количество амплифицируемой ДНК в пробе (в количестве копий за ПЦР) определяется посредством ПЦР в реальном времени. Достаточным условием принятия данных является, показатель LOD_{prac} если он не превышает 0,9 % для содержащей ГМО ДНК.

А.5.2.15.8 Идентификация

Результат метода экстракции ДНК может быть проверен с помощью специфических для сои, справочных методик как описано в ИСО 21570:2005 [41].

А.5.2.16 Идентификация образцов

Все образцы должны быть идентифицированы.

А.5.2.17 Вычисления

Для вычисления LOD_{prac} см. 5.2.3.4.

А.5.2.18 Хранение материалов

Хранение материалов должно соответствовать ИСО/МЭК 17025 [39].

А.5.2.19 Отчет

Отчет должен быть выполнен, как определено в ИСО 24276 и других применимых стандартах (ИСО/МЭК 17025 [39]).

А.5.2.20 Меры по обеспечению безопасности

При использовании перчаток следует убедиться, что они не содержат талька. Загрязнение предотвращают при помощи стерильных расходных материалов (носики, пробирки).

А.5.2.21 Предотвращение загрязнения и вывоз отходов

См. ИСО 24276.

Приложение В
(обязательное)

Методы количественной оценки выделенной ДНК

В.1 Основной метод ультрафиолетовой спектрометрии

В.1.1 Общие положения

В настоящем приложении описывается систематический метод определения концентрации ДНК в растворах.

В.1.2 Статус валидации

Настоящий метод был проверен путем кольцевого тестирования, результаты были опубликованы в [35]. Например, метод был успешно применен при межлабораторных сличениях по обнаружению ГМО, организованных Федеральным министерством общественного здравоохранения в Берне и кантональными лабораториями Базеля и Цюриха (Щвейцария).

В.1.3 Принцип

Нуклеиновые кислоты в растворе поглощают ультрафиолетовый (УФ) свет в диапазоне 210—300 нм с максимумом поглощения на длине волны 260 нм. Поскольку ДНК, РНК и нуклеотиды имеют максимум поглощения на длине волны 260 нм, то загрязнение растворов ДНК и РНК нуклеотидами не может быть определено УФ-спектрометрией. По этой причине до определения ДНК необходимо ферментативное удаление РНК во время выделения ДНК. Также необходимо удалить олигонуклеотиды и нуклеотиды, полученные при гидролизе РНК (например, обработкой диоксидом кремния, как указано в А.4.1.7.2). Если не удалить образованные при обработке рибонуклеазой олигонуклеотиды и нуклеотиды (например, обработкой диоксидом кремния), это может привести к завышению содержания ДНК в образце. Кроме того, двухцепочечная ДНК абсорбирует меньше УФ-света по сравнению с одноцепочечной ДНК. Поскольку доля одноцепочечной ДНК в растворе неизвестна, то, чтобы избежать завышения содержания ДНК, вся ДНК в испытуемом образце превращается в одноцепочечную форму путем использования гидроксида натрия в качестве денатурирующего агента. Так как нуклеиновые кислоты не поглощают на длине волны 320 нм, показание на этой длине волны является информативным для определения фонового поглощения в результате рассеяния света и присутствия УФ-активных компонентов.

Построение калибровочного графика не является обязательным при условии, что соответствующий молярный коэффициент экстинкции выбран в зависимости от типа исследуемой нуклеиновой кислоты и/или ее целостности.

Однако необходимо периодически проверять калибровку спектрометра путем измерения концентрации эталонных растворов ДНК.

В.1.4 Область применения

Метод применим к концентрациям ДНК в диапазоне от 2 до 50 мкг/см^3. Перед количественным анализом необходимо сделать соответствующие разбавления выделенной ДНК, подлежащей количественному определению, чтобы ее концентрация находилась в линейном диапазоне спектрометрического измерения (оптическая плотность — между 0,05 и 1).

Примечание — Следует учитывать, что остаточные соединения (например, ЦТАБ, оставшийся в результате процедуры экстрагирования ДНК) могут оказывать негативное влияние на УФ-спектрометрическое обнаружение на длине волны 260 нм. Это связано с тем, что данные соединения также поглощают на этой длине волны.

В.1.5 Реактивы

В.1.5.1 Трис(оксиметил) аминометан (Трис) ($C_4H_{11}NO_3$).

В.1.5.2 Гидроксид натрия (NaOH).

В.1.5.3 Соляная кислота, *c* (HCl) = 37 %-ная.

В.1.5.4 ДНК-носитель, например ДНК[1)] спермы сельди или вилочковой железы телят.

В.1.5.5 Эталонный раствор ДНК

Основной раствор ДНК массовой концентрации 10 мг/см^3 готовят, растворив 100 мг ДНК-носителя (В.1.5.4) в 10 см^3 буфера для разбавления (В.1.5.7). ДНК растворяется при этой концентрации очень медленно, и конечный раствор очень вязкий. Затем разбавляют этот приготовленный основной эталонный раствор ДНК буфером для разбавления до требуемой рабочей концентрации (например, 25 мкг/см^3).

В.1.5.6 Раствор гидроксида натрия, *c* (NaOH) = 2 моль/дм^3.

В.1.5.7 Буфер для разбавления, *c* (Трис) = 0,01 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 9,0 ед. pH, используя HCl.

---

1) Эти продукты имеются в Sigma как D-7290 и D-1501 соответственно. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательное применение данных реактивов. Могут использоваться эквивалентные реактивы, если их применение приводит к тем же результатам.

В.1.6 Оборудование

В.1.6.1 УФ-спектрометр, допускаются одно-, двулучевые или фотодиодные приборы.

В.1.6.2 Смеситель, например Vortex.

В.1.6.3 Сосуды для измерения, например кварцевые или пластмассовые кюветы или пластиковые ячейки (планшеты), пригодные для УФ-обнаружения на длине волны 260 нм.

Размер используемых сосудов для измерения определяется объемом раствора для измерения: полумикрокюветы — 1000 мм^3, микрокюветы — 400 мм^3, ультрамикрокюветы — 100 мм^3, кварцевые капилляры 3—5 мм^3. Оптический путь стандартной кюветы составляет обычно 1 см.

В.1.7 Методика

В.1.7.1 Измерение эталонного раствора ДНК

Для обеспечения правильной калибровки спектрометр проверяют путем проведения следующих измерений с использованием эталонного раствора ДНК:

- при измерении фона (контрольного раствора) измерительный сосуд заполняют только буфером для разбавления (В.1.5.7);
- при измерении эталонного раствора измерительный сосуд заполняют эталонным раствором ДНК (В.1.5.5).

Поглощение контрольного раствора и эталонного раствора ДНК измеряют для обоих случаев на длинах волн 260 и 320 нм.

В.1.7.2 Измерение испытуемого раствора ДНК неизвестной концентрации

Для приготовления контрольного раствора смешивают буфер для разбавления (В.1.5.7) с раствором гидроксида натрия (В.1.1.5.13) таким образом, чтобы была достигнута конечная молярная концентрация NaOH 0,2 моль/дм^3. Этой смесью заполняют измерительный сосуд.

Смешивают испытуемый раствор ДНК с раствором гидроксида натрия, чтобы получить конечную концентрацию NaOH 0,2 моль/дм^3 (в случае необходимости смешивают и с буфером для разбавления). Этой смесью заполняют измерительный сосуд.

Выдерживают как контрольный раствор, так и эталонный раствор ДНК в течение 1 мин и проводят измерения при длинах волн 260 и 320 нм. Показание устойчиво в течение не менее 1 ч.

Пример 1 — Для приготовления контрольного раствора смешивают 90 мкл буфера для разбавления и 10 мкл раствора гидроксида натрия и переносят в измерительный сосуд вместимостью 100 мм^3.

Пример 2 — Для приготовления испытуемого раствора ДНК смешивают 80 мм^3 буфера для разбавления или воды, 10 мм^3 раствора гидроксида натрия и 10 мм^3 раствора ДНК неизвестной концентрации и переносят в измерительный сосуд вместимостью 100 мм^3.

В.1.8 Оценка

Для определения фонового значения поглощения (оптической плотности) OD при длине волны 320 нм вычитают из значения поглощения при длине волны 260 нм, получая исправленное значение поглощения при 260 нм.

Если исправленное значение OD при 260 нм равняется 1,0, то расчетная концентрация ДНК составляет 50 мкг/см^3 для двухцепочечной ДНК или 37 мкг/см^3 для одноцепочечной ДНК (например, денатурированной гидроксидом натрия) соответственно.

Для получения достоверных измерений значения OD при длине волны 260 нм должны быть более 0,05.

Массовую концентрацию испытуемого раствора двухцепочечной ДНК с учетом денатурации и используемого коэффициента разбавления рассчитывают по формуле

$$c_{ДНК} = F \cdot (OD_{260} - OD_{320}) \cdot 37, \qquad (В.1)$$

где F — коэффициент разбавления;

OD_{260} — поглощение при длине волны 260 нм;

OD_{320} — поглощение при длине волны 320 нм;

37 — переводной коэффициент, мкг/см^3.

Пример — Коэффициент разбавления составляет 10, значение OD_{260} — 0,658 и значение OD_{320} — 0,040:

$$C_{ДНК} = 10 \cdot (0{,}658 - 0{,}040) \cdot 37 \text{ мкг/см}^3 = 229 \text{ мкг/см}^3.$$

В.2 Метод электрофореза в агарозном геле и окрашивания бромистым этидием

В.2.1 Общие положения

В настоящем приложении описывается систематический метод определения концентрации ДНК в растворах. Электрофорез ДНК в агарозном геле и окрашивание бромистым этидием (EtBr) позволяют оценить количество ДНК и в то же время проанализировать ее физическое состояние (например, степень деградации, присутствие остаточной РНК и некоторых загрязнителей). Метод также применяется в случаях, если имеется недостаточное количество ДНК для спектрометрического обнаружения или если ДНК недостаточно очищена и может содержать вещества, которые поглощают ультрафиолетовое излучение [36]. Электрофорез в геле обычно не рекомендуется

применять для количественного определения ДНК в том случае, если она подверглась деградации. В этом случае следует применять другие методы.

В.2.2 Статус валидации

Этот метод на протяжении многих лет широко применялся при различных исследованиях, однако никогда не проверялся при межлабораторных исследованиях по обнаружению ГМО в пищевых продуктах.

В.2.3 Принцип

ДНК загружается на молекулярное сито (агарозный гель) и подвергается воздействию электрического поля в присутствии буферного раствора [37]. С помощью электрофореза ДНК разделяется в зависимости от ее заряда и молекулярной массы.

EtBr встраивается (интеркалирует) в ДНК и при возбуждении ультрафиолетовым светом излучает оранжевую флуоресценцию. Поскольку значение флуоресценции пропорционально общей массе ДНК, то количество ДНК в образце можно оценить путем сравнения флуоресценции, излучаемой неизвестным образцом, с флуоресценцией, излучаемой набором эталонных растворов ДНК с известным количеством ДНК. Молекулярная масса таких стандартов должна быть аналогична молекулярной массе ДНК, подлежащей количественному анализу, так как встраивание EtBr в ДНК и возникающее в результате него излучение флуоресценции также зависят от длины фрагментов ДНК. EtBr также окрашивает одноцепочечную ДНК и РНК. Для более точной оценки содержания ДНК необходимо с помощью ферментов удалить одноцепочечную ДНК и РНК.

В.2.4 Область применения

Метод применим к концентрациям ДНК в приблизительном диапазоне от 5 до 500 нг при использовании систем регистрации фотоизображений. Системы видеодокументации с камерой CCD могут обеспечить более высокую чувствительность.

В.2.5 Меры безопасности

Поскольку EtBr является мощным мутагеном и канцерогеном, при обращении с ним следует соблюдать меры предосторожности. Обязательным требованием является использование перчаток. Все растворы и гели, содержащие EtBr, перед выбросом и удалением необходимо подвергать дезактивации (см. [36]).

УФ-излучение особенно опасно для сетчатой оболочки глаза. При работе с УФ-излучением всегда необходимо надевать защитные очки или защитную маску.

В.2.6 Реактивы

Электрофорез в агарозном геле может выполняться с применением как буфера TAE, так и буфера TBE.

Применение этого метода не требует наличия реактивов степени чистоты, применяемой в молекулярной микробиологии. Используемые в данном методе растворы обычно не нуждаются в автоклавировании.

В.2.6.1 Агароза, пригодная для электрофореза ДНК и разделения молекул ДНК предполагаемого размера.

В.2.6.2 Борная кислота (H_3BO_3), только для буферной системы TBE.

В.2.6.3 Бромфеноловый синий ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) и/или ксилол цианол FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$).

В.2.6.4 Стандарт количества ДНК соответствующей молекулярной массы (линейная ДНК фага Лямбда для высокомолекулярных масс ДНК и подвергшаяся рестрикции низкомолекулярная ДНК фага Лямбда для низкомолекулярных масс ДНК).

В.2.6.5 Стандарт молекулярной массы ДНК, например коммерческий препарат, содержащий фрагменты ДНК от очень высокой до очень низкой молекулярной массы.

В.2.6.6 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH), только для буферной системы TAE.

В.2.6.7 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2ЭДТА) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

В.2.6.8 Бромистый этидий (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$).

В.2.6.9 Глицерин ($C_3H_8O_3$).

В.2.6.10 Ацетат натрия ($C_2H_3O_2Na$), только для буферной системы TAE.

В.2 6.11 Соляная кислота, *с* (HCl) = 37 %-ная.

В.2.6.12 Гидроксид натрия (NaOH).

В.2.6.13 Трис(оксиметил) аминометан (Трис) ($C_4H_{11}NO_3$).

В.2.6.14 Буферный раствор TAE (1×), *с* (Трис) = 0,050 моль/дм^3, *с* ($C_2H_3O_2Na$) = 20 моль/дм^3, *с* (Na_2ЭДТА) = = 0,001 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH ледяной уксусной кислотой или NaOH. Целесообразно готовить буферный раствор TAE в виде концентрированного основного раствора (максимум 50-кратной концентрации). Не следует использовать буфер при появлении видимого осадка. Разбавление концентрированных буферных растворов для электрофореза нестерильной, однократно перегнанной или деионизированной водой может выполняться непосредственно перед их использованием.

В.2.6.15 Трис боратный буферный раствор (TBE) (0,5×), *с* (Трис) = 0,055 моль/дм^3, *с* (борная кислота) = = 0,055 моль/дм^3, *с* (Na_2ЭДТА) = 0,001 моль/дм^3.

Доводят значение pH до 8,0 ед. pH, используя HCl или NaOH. Целесообразно готовить буферный раствор TBE в виде концентрированного основного раствора (максимум 10-кратной концентрации. Не следует использовать буфер при появлении видимого осадка. Разбавление концентрированных буферных растворов для электрофореза нестерильной, однократно перегнанной или деионизированной водой может выполняться непосредственно перед их использованием.

В.2.6.16 Буферный раствор для загрузки пробы (5×), в буферном растворе для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15) *c* (глицерин) = 50 %, *c* (бромфеноловый синий) = 2,5 г/дм^3 и/или *c* (ксилол цианол) = 2,5 г/дм^3.

В.2.6.17 Раствор бромистого этидия, *c* (EtBr) = 0,5 мг/дм^3

Целесообразно хранить раствор бромистого этидия в виде концентрата (например, 10 мг/см^3) при температуре 5 °С в темноте (EtBr чувствителен к свету). Также желательно избегать взвешивания EtBr. Основной раствор необходимо готовить путем растворения порошка EtBr, уже находящегося в сосуде, соответствующим количеством воды или применяя предварительно взвешенные таблетки EtBr. Растворение EtBr следует выполнять в месте, защищенном от света, перемешивать при комнатной температуре. Обычно это занимает приблизительно 1 ч.

В.2.7 Оборудование

В.2.7.1 Печь микроволновая или кипящая водяная баня.

В.2.7.2 Оборудование для электрофореза в агарозном геле со вспомогательными принадлежностями и источником питания.

В.2.7.3 Ультрафиолетовый трансоблучатель или лампа, предпочтительно с длиной волны 312 нм.

Альтернативно могут использоваться оборудование для колоночной хроматографии нуклеиновых кислот и соответствующая система обнаружения или другие аналогичные системы.

В.2.7.4 Регистрирующий прибор, например система фотодокументации с пленкой 3000 ASA и УФ-фильтром, соответствующим флуоресценции, излучаемой EtBr.

Альтернативно могут использоваться система видеодокументации с камерой CCD, соответствующий УФ-фильтр и (при необходимости) программное обеспечение количественного анализа.

В.2.8 Методика

В.2.8.1 Общие положения

Электрофорез в агарозном геле может выполняться с применением как буфера TAE, так и буфера TBE. Допускается использовать один и тот же буфер для растворения агарозы и заполнения ячейки для электрофореза.

В.2.8.2 Приготовление агарозного геля

Гель должен быть не толще 1 см.

Концентрация агарозы и ее качество определяют разрешающую способность геля. Для количественного анализа ДНК с высокой молекулярной массой используются массовые концентрации агарозы от 8 до 10 г/дм^3. Для количественного анализа ДНК с низкой молекулярной массой (например, деградированной или подвергнутой действию рестриктазы) используются более высокие концентрации агарозы (до 40 г/дм^3) [38].

Взвешивают соответствующее количество агарозы (В.2.6.1) и добавляют ее в буферный раствор для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15). Кипятят раствор в микроволновой печи или водяной бане (В.2.7.1) до полного растворения агарозы. Дополняют объем, потерянный в результате выпаривания, эквивалентным количеством воды, перемешивают при взбалтывании (следует избегать захвата пузырьков воздуха), охлаждают раствор до температуры приблизительно 60 °С и выдерживают его при этой температуре до использования. Готовят гелевую подложку (лоток для геля) с соответствующей гребенкой для пробы, расположенной в правильном положении. Наливают раствор агарозы на гелевый лоток и дают возможность гелю загустеть при комнатной температуре (обычно рекомендуется в течение 1 ч).

В.2.8.3 Приготовление пробы ДНК

Смешивают растворы пробы ДНК (например, 5—10 мм^3) с приблизительно 20 % (относительно окончательного объема пробы) буфера для загрузки (В.2.6.16) (например, добавляют 2,5 мм^3 буфера для загрузки к 10 мм^3 пробы ДНК), перемешивают и вносят смесь в лунки (гнезда) для пробы с помощью микропипетки. Если предполагается, что неизвестные образцы будут очень концентрированными, то необходимо разбавить их перед загрузкой в гель.

Для определения размера выделенных фрагментов ДНК добавляют буфер для загрузки пробы (В.2.6.16) (в соотношении 20 % относительно объема пробы) к соответствующему количеству стандарта молекулярной массы ДНК (В.2.6.5) и параллельно проводят электрофорез.

Для оценки концентрации неизвестного образца следует анализировать параллельно стандартные образцы количества ДНК. Такие образцы содержат известные количества стандарта ДНК (В.2.6.4) (в пределах динамической области применения метода, т. е. от 5 до 500 нг), разбавленного водой или буфером для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15). Рекомендуется использовать стандарты количества, содержащие по меньшей мере пять калибровочных точек (т.е. различные количества ДНК).

В.2.8.4 Проведение электрофореза

Осторожно вынимают гребенку для образцов из геля. Переносят гель (вместе с лотком) в ячейку для электрофореза таким образом, чтобы лунки находились как можно ближе к катоду (отрицательному электроду). Заполняют ячейку буфером для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15). Покрывают гель слоем того же буфера толщиной 2 мм и загружают анализируемые пробы с помощью микропипетки.

Выполняют электрофорез при комнатной температуре при соответствующем напряжении и энергоемкости (обычно рекомендуется максимальное неизменное напряжение 5 В/см для расстояния между электродами). В указанных условиях ДНК имеет отрицательный заряд, поэтому она мигрирует от катода к аноду. Время электрофореза зависит от требуемого расстояния миграции, тока, вырабатываемого источником энергии, электроэндоосмоса и концентрации агарозы в геле.

В.2.8.5 Окрашивание

После завершения электрофореза выдерживают гель в течение 15—50 мин в растворе бромистого этидия (В.2.6.17) при комнатной температуре, если возможно, в темноте (и/или в сосуде из нержавеющей стали с крышкой), осторожно встряхивая.

При необходимости уменьшения фонового окрашивания необходимо поместить гель в воду на 10—30 мин.

Как вариант можно добавлять EtBr к гелю перед его разливом. В этом случае добавляют EtBr к гелю до конечной массовой концентрации 0,01 мг на миллиметр геля, охлажденного до температуры 60 °С.

Если гель разливается вместе с бромистым этидием, загружают неизвестный образец и стандарт количества ДНК (В.2.6.4) в отдельные лунки, образованные той же гребенкой на том же геле. Иначе количество бромистого этидия будет различным для образца и стандарта, что приведет к ошибочным результатам количественного анализа. Чтобы свести к минимуму проблемы, связанные с движением EtBr в геле, некоторое количество EtBr может быть также добавлено к буферу для электрофореза (в ячейку). После электрофореза в геле обычно не требуется проведения стадии удаления окрашивания.

В данном случае после окончания электрофореза удаление окрашивания обычно не проводится.

В.2.8.6 Регистрация геля

Переносят гель на поверхность трансоблучателя, включают УФ-свет и регистрируют флуоресценцию ДНК с помощью фото- или видеозаписи.

В.2.9 Оценка/интерпретация результатов

Содержание ДНК в образце оценивают, сравнивая неизвестные образцы с образцами стандартного количества ДНК, которые подвергаются электрофорезу параллельно. Эта оценка может выполняться визуально или с помощью программного обеспечения количественного анализа, пригодного для расчета адекватной калибровочной кривой.

В.3 Метод ПЦР в реальном времени для количественного анализа выделенной ДНК

При выделении ДНК из продуктов с низким содержанием ДНК количественный анализ не всегда возможно провести обычными физическими методами (например, методами, описанными в настоящем приложении) по причине их недостаточной чувствительности. Если необходим такой количественный анализ, то можно использовать метод ПЦР в реальном времени. Этот метод также дает информацию относительно способности применения выделенных молекул ДНК для ПЦР, которую нельзя получить путем выполнения физических измерений концентраций ДНК. Более подробно метод описан в ИСО 21570.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ИСО 21568:2003	—	*
ISO 24276:2006	MOD	ГОСТ Р 53214—2008 (ИСО 24276—2006) «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения»

* Соответствующий национальный стандарт Российской Федерации отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- MOD — модифицированный стандарт.

Библиография

[1] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.: Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons (1988) (ISBN 0-471-50338-X)

(Современные методы в молекулярной биологии)

[2] Sambrook J., Russel D. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001) (ISBN 0-87969-576-5)

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство)

[3] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis, T., eds. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, 1989 [Superseded by Green M.R., Sambrook J., eds. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th Edition, 2012]

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство)

[4] Prokisch J., Zeleny R., Trapmann S., Le Guern L., Schimmel H., Kramer G.N., Pauwels J. Estimation of the minimum uncertainty of DNA concentration in a genetically modified maize sample candidate certified reference material. Fresenuis J. Analy. Chem. (2001) 370(7) pp. 935—9

(Оценка минимальной неопределенности измерений концентрации ДНК в пробе генетически модифицированной кукурузы, аттестуемой в качестве стандартного образца)

[5] Sambrook J., Fritsch E.F and Maniatis T. In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Vol. 3, Appendix E.3, Purification of nucleic acids. (1987) (ISBN 0-87969-309-6)

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство)

[6] Detection of a genetic modification of *Lactobacillus curvatus* in uncooked-meat sausage by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 08.00-44 In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods. Federal Health Office, September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH

(Обнаружение генетической модификации *Lactobacillus curvatus* в колбасе из мясного фарша, не подвергавшегося тепловой обработке, путем амплификации модифицированной последовательности ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продукта ПЦР с образцом ДНК. L 08.00-44)

[7] Straub J.A., Hertel C. and Hammes W.P. The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. Eur. Food Res. Technol. (1999) 210, pp. 62—67

(Судьба рекомбинированной ДНК в колбасах, подвергнутых ферментации и термической обработке)

[8] Straub J.A., Hertel C. and Hammes W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. J. Food Protect. (1999) 62, pp. 1150—1156

(Система обнаружения *Staphylococcus aureus* в заквасочных культурах мясной продукции и в молочной продукции, основанная на обнаружении 23S рДНК путем полимеразной цепной реакции)

[9] Lick S., Keller M., Bockelmann W., Heller K.J. Optimized DNA extraction method for starter cultures from yoghurt. Milk Sci. Int. (1998) 51, pp. 183—186

(Оптимизированный метод экстрагирования ДНК из заквасочных культур йогурта)

[10] Lick S., Heller K.J. Quantitation by PCR of yoghurt starters in a model yoghurt produced with a genetically modified *Streptococcus thermophilus*. Milk Sci. Int. (1998) 53, pp. 671—675

(Количественное определение методом ПЦР заквасочных культур в йогурте, приготовленном с использованием генетически модифицированного *Streptococcus thermophilus*)

[11] Detection of a genetic modification of *Streptococcus thermophilus* in yoghurt by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 02.02-4 In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods. Federal Health Office, September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH

(Обнаружение генетической модификации *Streptococcus thermophilus* в йогурте путем амплификации модифицированной последовательности ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продукта ПЦР с пробой ДНК. L 02.02-4)

[12] Lick S., Keller M., Krusch U., Heller K.J. Identification of starter cultures in thermally treated plain yoghurt using geneprobes and PCR. J. Dairy Res. (1998) 63, pp. 607—613

(Идентификация заквасочных культур в обычном йогурте, подвергнутом термической обработке, используя генопробы и ПЦР)

[13] Van Vaerembergh B., Grootaert B., Moens W. Validation of a method for the preparation of fungal genomic DNA for Polymerase chain reaction (PCR) and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). J. Mycol. Mèd. (1995) 5, pp. 133—139

[Подтверждение эффективности метода подготовки геномной ДНК грибков к полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD)]

[14] Haynes K.A., Westerneng T.J., Fell J.W., Moens W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain amplification of large subunit ribosomal DNA. J. Med.& Vet. Mycology (1995) 33, pp. 319—325

(Быстрое обнаружение и идентификация патогенных грибов путем амплификации больших субъединиц рибосомной ДНК методом полимеразной цепной реакции)

[15] Guillaume G.: Verbrugge D., Chasseur-Libotte M.-L., Moens W., Collard, J.-M.: PCR typing of tetracycline determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. In: FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32, pp. 77—85

(Типирование определителей тетрациклина (Tet A-E) методом ПЦР в *Salmonella enterica* Hadar и в микробном сообществе активного ила, отобранного на станциях по очистке сточных вод больниц и городских предприятий Бельгии)

[16] Pedersen LH., Skouboe P., Boysen M., Soule J., Rossen L.: Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction, Int. J. Food Microbiol., 1997, 35(2), pp. 169—77

(Обнаружение видов *Penicillium* в пробах пищевых продуктов сложного состава, используя полимеразную цепную реакцию)

[17] Ahn S.J., Costa J., Emanuel J.R. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. Nucleic Acids Res. 1996, 13 pp. 2623—2625

(Количественное определение ДНК с помощью PicoGreen: эффективная оценка образцов до и после ПЦР)

[18] Haugland R.A., Heckman J.L., Wymer L.J. Evaluation of different methods for the extraction of fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. In: J.Microbiol. Methods, 1999, 37(2), pp. 165—176

(Оценка различных методов экстрагирования конидий грибов путем количественного конкурентного ПЦР-анализа)

[19] Kim C.S., Lee C.H., Shin J.S., Chung Y.S., and Hyung N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic Acids Research, 1997, 25, No. 5, pp. 1085—1086

(Простой и быстрый метод выделения высококачественной геномной ДНК из плодовых и хвойных деревьев с использованием ПВП)

[20] Berthelet M., Whyte L.G., and Greer C.W.: Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. FEMS Microbiology Letters, 1996, 138, pp. 17—22

(Быстрая, прямая экстракция ДНК из почв для выполнения анализа ПЦР с использованием вращающейся колонки из поливинилполипирролидона)

[21] Petit F., Craquelin S., Guespin-Michel J., and Buffet-Janvresse C. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. Res. Microbiol., 1999, 150, pp. 143—151

(Выделение нуклеиновых кислот из загрязненной речной воды для обнаружения вирусов и бактерий путем анализа ПЦР и ПЦР в реальном времени)

[22] Watson R.J., and Blackwell B.: Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol., 2000, 46, pp. 633—642

(Очистка и охарактеризование общего компонента почв, который ингибирует полимеразную цепную реакцию)

[23] Griffiths R. J., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., and Bailey M.J.: Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66, No. 12, pp. 5488—5491

(Экспресс-метод совместной экстракции ДНК и РНК из проб естественной окружающей среды для анализа состава микробных сообществ на основе метода рибосомной ДНК и рРНК)

[24] Rogers S.O. and Bendich A.J. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual A6 (1988) pp. 1—10

(Выделение ДНК из растительных тканей. Руководство № А6 по молекулярной биологии растений)

[25] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of soya beans by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 23.01.22-1, March 1998. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco prod-ucts, cosmetics and commodity goods/BgVV). March 1998 Bd. 1 1999-03 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH

(Анализ пищевой продукции. Обнаружение генетической модификации сои путем амплификации модифицированной последовательности ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продукта ПЦР с образцом ДНК. L 23.01.22-1)

[26] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 24.01-01, February 1996, revised in January 1997. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgVV). Jan 1997 Bd. 1 (1997-01 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH

(Анализ пищевой продукции. Обнаружение генетической модификации картофеля путем амплификации модифицированной последовательности ДНК, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гибридизацию продукта ПЦР с образцом ДНК. L 24.01.01)

[27] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of tomatoes bean by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 25.03.01-1, November 1999. In: Amtliche Sammlung von Unter-suchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgW). Nov 1999 Bd. 1 (1999-11 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH

(Анализ пищевой продукции. Обнаружение генетической модификации томатов путем амплификации модифицированной последовательности ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продукта ПЦР с образцом ДНК. L 25.03.01-1)

[28] Boyle J.S. and Lew A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification, Trends in Genetics, Vol. 11(1), p. 8, 1995

(Недорогая альтернатива микропористому стеклу для очистки ДНК)

[29] Brodmann P., Eugster A., Hubner Ph., Meyer R., Pauli U., Vögeli U. and Lüthy J. Nachweis gen-technisch veränderter Roundup Ready™ Sojabohnen mittels der Polymerase — Kettenreaktion (PCR). Methodenvorprüfung im Rahmen der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 1997, 88, pp. 722—731

[Обнаружение генетически модифицированной сои (раундап-реди) с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР)]

[30] Hübner P., Studer E. and Lüthy J. Quantitative Competitive PCR for the Detection of Genetically Modified in Food. Food Control, 1999, 10, pp. 353—358

(Количественный конкурентный анализ ПЦР для обнаружения генетически модифицированных организмов в пищевой продукции)

[31] Hübner P., Studer E. and Lüthy J. Quantitation of genetically modified organisms in food. Nat Biotechnol. 1999, 17, pp. 1137—1138

(Количественная оценка генетически модифицированных организмов в пищевой продукции)

[32] Melzak K.A., Sherwood C.S., Turner R.F.B. and Haynes C.A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. J. Colloid and Interface Science, 1996, 181, pp. 635—644

(Адсорбция ДНК диоксидом кремния в перхлоратных растворах)

[33] Patents: EP 0389063, USP5, 234, 809

(Патенты: EP 0389063, USP5, 234, 809)

[34] Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed., Vol. 5, Appendix B 16, 1989 Proteinase-K. (ISBN 0-87969-509-6)

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство. Протеиназа-К)

[35] Swiss Food Manual, Chapter 52B, Section 1 to 5. (2000) Eidgenössische Drucksachen und Materialzentrale, CH-5005 Bern, available on CD.

(Швейцарское пособие по пищевой продукции, глава 52В, разделы 1—5)

[36] Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed., Vol. 5, Appendix 5, (1989) Quantitation of DNA and RNA (ISBN 0-88989-509-8)

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство. Количественная оценка ДНК и РНК)

[37] Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed., Vol. 1, Chapter 6, (1989) Gel electrophoresis of DNA (ISBN 0-88989-509-8)

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство. Электрофорез ДНК в геле)

[38] Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed., Vol. 1, Section 6.5, table 8.1 (1989) (ISBN 0-88989-509-8)

(Молекулярное клонирование. Лабораторное руководство)

[39] ISO/IEC 17025:2005

General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

(Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[40] ISO 21569:2005

Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods

(Продукты пищевые. Методы анализа обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Качественные методы на основе нуклеиновых кислот)

[41] ISO 21570:2005

Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods

(Продукты пищевые. Методы анализа обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Количественные методы на основе нуклеиновых кислот)

[42] ISO Guide 30:1992

Terms and definitions used in connection with reference materials

(Термины и определения, используемые в области стандартных образцов)

[43] ISO 5725-1

Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions

[Точность (подлинность и прецизионность) методов измерения и результатов — часть 1. Общие принципы и определения]

[44] Wurz A., Rüggeberg H., Brodmann P., Waiblinger H.-U., Pietsch K. DNA-Extraktionsmethode für den Nachweis gentechnisch veränderter Soja in Sojalecithin [DNA extraction method for the detection of genetically modified soy in soy lecithin]. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 1998, 94 pp. 159—161

[Метод экстракции ДНК для обнаружения генетически модифицированной сои в соевом лецитине]

[45] Waiblinger H.-U., Ernst B., Graf N., Pietsch K. Ringtrial validation of a method for the extraction of DNA from soy lecithins. *J. Verbrauch. Lebensm.* 2007, 2 pp. 113—115

[Кольцевое подтверждение эффективности метода экстракции ДНК из соевых лецитинов]

[46] Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.* 1995, 67, pp. 31—343

[Протокол для планирования, руководства и интерпретации исследований рабочих характеристик методов]

УДК 579.672:637.065:006.354 ОКС 67.050 ОКСТУ 9109
9209
9709

Ключевые слова: пищевые продукты, зерновые культуры, нуклеиновые кислоты, общие требования, методы выделения, очистки и количественного определения

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 14.12.2015. Подписано в печать 05.02.2016. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,12. Уч.-изд. л. 4,60. Тираж 36 экз. Зак. 392.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4
gost.e-ecolog.ru ıstinfo.ru

Поправка к ГОСТ Р ИСО 21571—2014 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Пункт 3. Таблица согласования	—	Азербайджан | AZ | Азстандарт

(ИУС № 1 2016 г.)

gost.e-ecolog.ru