ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ИСО 21570-2009

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Метады аналізу для выяўлення генетычна мадыфікаваных арганізмаў і вытворных прадуктаў. Колькасныя метады, якія заснаваны на нуклеінавай кіслаце

(ISO 21570:2005, IDT)

Издание официальное

БЗ 9-2010

Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0-92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2-97 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Порядок разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 36 от 11 ноября 2009 г.)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту 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 для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте).

Международный стандарт разработан CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN) совместно с ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO) в соответствии с Соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венским соглашением).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Госстандарте Республики Беларусь.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от от 24 сентября 2010 г. № 58 непосредственно в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 1 января 2011 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах.

© Госстандарт, 2010

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания на территории Республики Беларусь без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Содержание

Введение VI
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Принцип метода 2
4.1 Общие положения 2
4.2 Амплификация, обнаружение и подтверждение продуктов ПЦР 2
4.3 Количественное определение продуктов ПЦР 2
5 Реактивы 2
6 Аппаратура и оборудование 2
7 Руководящие указания, касающиеся методики 2
7.1 Общие положения 2
7.2 Стабильность целевой последовательности 3
7.3 Калибровка анализа 3
7.4 Рассмотрение количественного определения 3
7.5 Требования к обеспечению качества 3
8 Оценка 4
9 Выражение результата 4
10 Отчет об испытании 5
Приложение А (справочное) Методы специфического целевого таксона 6
А.1 Метод специфического целевого таксона для определения абсолютного количественного содержания ДНК гена *adh*1 из кукурузы с использованием метода ПЦР в реальном времени 6
Приложение В (справочное) Методы скрининга 11
В.1 Метод скрининга для определения относительного количественного содержания ДНК 35S-промотора сои линии GTS 40-3-2 с использованием метода ПЦР в реальном времени 11
Приложение С (справочное) Методы специфической конструкции 17
С.1 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 с использованием ПЦР в реальном времени (метод 1) 17
С.2 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 с использованием ПЦР в реальном времени (метод 2) 22
С.3 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы Event176 с использованием ПЦР в реальном времени 30
С.4 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-сои линии GTS 40-3-2 с использованием ПЦР в реальном времени 36
С.5 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии MON 810 с использованием ПЦР в реальном времени 42
С.6 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии Event176 с использованием ПЦР в реальном времени 49
С.7 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии Bt11 с использованием ПЦР в реальном времени 56

C.8 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии GA21 с использованием ПЦР в реальном времени....63

C.9 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии T25 с использованием ПЦР в реальном времени....69

Приложение D (справочное) Методы специфического события....77

D.1 Метод специфического события для абсолютного и относительного количественного определения содержания кукурузы линии Bt11 с использованием ПЦР в реальном времени....77

D.2 Метод специфического события для относительного количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии MON 810 с использованием ПЦР в реальном времени....83

Библиография....89

Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам....95

Введение

Исследование генетически модифицированных организмов (далее – ГМО) и производных продуктов осуществляется посредством следующих стадий, выполняемых последовательно или одновременно. После отбора проб нуклеиновые кислоты экстрагируются из навески пробы. Экстрагированные нуклеиновые кислоты далее могут быть очищены в процессе экстрагирования или после него. Следующими стадиями являются: оценка количества экстрагированных нуклеиновых кислот (при необходимости), разведение нуклеиновых кислот (при необходимости) и выполнение аналитических процедур, например полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР). Указанные стадии подробно изложены в настоящем стандарте и следующих международных стандартах:

– ISO 21568 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Отбор проб»;

– ISO 21569 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Качественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте».

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

Международная организация по стандартизации (ISO) обращает внимание на то, что соблюдение настоящего стандарта включает использование патентов, касающихся ПЦР-технологии.

ISO не устанавливает никаких требований в части обоснованности и сферы применения патентных прав.

ISO было проинформировано, что компании Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. и Hoffman-La Roche являются держателями патентных прав, касающихся ПЦР-технологии. Компании гарантировали ISO свою готовность вести переговоры о лицензиях на приемлемых и недискриминационных условиях с заявителями по всему миру. В этой связи заявления держателей этих патентных прав зарегистрированы ISO. Информация может быть получена от Licensing Department Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City,CA 94404, USA (США) и Roche Molecular Systems, Inc. Licensing Department 1145 Atlantic Avenue Alameda, CA 94501, USA (США).

Следует обратить внимание на возможность того, что некоторые элементы настоящего стандарта могут быть предметом патентных прав, отличных от вышеописанных. ISO не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов.
Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Метады аналізу для выяўлення генетычна мадыфікаваных арганізмаў і вытворных прадуктаў.
Колькасныя метады, якія заснаваны на нуклеінавай кіслаце

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

Дата введения 2011-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общий перечень количественных методов обнаружения ГМО в пищевых продуктах с использованием ПЦР.

Стандарт устанавливает общие требования к специфической амплификации целевых последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – ДНК) с целью количественной оценки содержания ДНК из ГМО и для подтверждения идентичности амплифицированной последовательности ДНК.

Целью руководящих принципов, включающих минимальные требования и критерии исполнения, изложенные в настоящем стандарте, является обеспечение сравнимости, точности и воспроизводимости результатов, получаемых в разных лабораториях.

Настоящий стандарт распространяется на матрицы пищевых продуктов, но может быть применен также и для других матриц, например кормов, растений.

Конкретные примеры методов приведены в приложениях A – D.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

ISO 21569:2005 Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Качественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте

ISO 21571:2005 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Извлечение нуклеиновой кислоты

ISO 24276 [1)] Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Общие требования и определения

ISO Guide 32:1997 Калибровка в аналитической химии с использованием аттестованных стандартных образцов

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют термины и определения, установленные в ISO 24276.

[1)] Готовится к изданию.

Издание официальное

4 Принцип метода

4.1 Общие положения

Количественный анализ заключается в количественном определении целевой последовательности ДНК в исследуемых образцах. Каждый метод определяет целевую (ые) последовательность (и).

Количественное определение может проводиться с использованием конкурентной ПЦР [1], [2] или ПЦР в реальном времени [3], [4].

Количественный анализ должен ясно выражать количество целевого генетического элемента относительно количества специфического стандарта, соответствующих калибровок и видов контроля и быть в пределах динамического диапазона применяемого аналитического метода и анализируемого образца.

Анализ, как правило, состоит из:

– амплификации одной или большего числа специфических целевых последовательностей;

– обнаружения и подтверждения специфичности продукта (ов) ПЦР;

– количественного определения амплифицированных фрагментов относительно калибровок.

Примечание – В случае анализа, проведенного с помощью ПЦР в реальном времени, амплификация, обнаружение и подтверждение происходят одновременно.

4.2 Амплификация, обнаружение и подтверждение продуктов ПЦР

Описание принципов амплификации, обнаружения и подтверждения последовательностей ДНК приведено в ISO 21569.

4.3 Количественное определение продуктов ПЦР

Принцип метода количественного определения, как правило, заключается в определении соотношения (выраженного в процентах) двух целевых последовательностей ДНК в последовательности, представляющей интересующий ГМО, и последовательности (эндогенной), специфической для целевого таксона. Однако в некоторых случаях количественное определение может также производиться по отношению к определенному количеству основного анализируемого вещества пищевого продукта (например, когда производится обнаружение генетически модифицированных (далее – ГМ) микроорганизмов в пищевых продуктах).

Материалы, применяющиеся для калибровки, которые используются для количественного определения, должны быть пригодными для контроля с сертифицированными эталонными материалами (далее – СЭМ), если таковые имеются. Если такие материалы отсутствуют, должны использоваться другие подходящие эталонные материалы. Примерное руководство приведено в [5]. Информация об исследованиях подтверждения достоверности и погрешности измерений приведена в международных исследованиях [6] – [9].

5 Реактивы

Все реактивы и материалы, использующиеся для анализа, должны быть идентичными или эквивалентными реактивам и материалам, указанным в методе. В противном случае все реактивы и материалы должны быть пригодными для проведения исследований в области молекулярной биологии. Реактивы должны храниться и использоваться в соответствии с рекомендациями изготовителей или в соответствии с техническими требованиями обеспечения качества лабораторных работ. Список реактивов приведен в приложениях A – D.

6 Аппаратура и оборудование

См. приложения A – D и ISO 24276.

7 Руководящие указания, касающиеся методики

7.1 Общие положения

Общие положения, имеющие отношение к ПЦР-амплификации для обнаружения ГМО, указаны в ISO 21569.

В приложениях A – D указаны методы ПЦР-обнаружения и описана возможность их применения. Для каждого метода подробно описаны рабочие характеристики.

Концентрация интересующей последовательности ДНК должна находиться в пределах динамического диапазона метода.

Примечание – Для определения, достаточно ли качества ДНК-матрицы (по длине и структурной целостности), а также достаточно ли ее чистоты и количества для обеспечения обнаружения и количественного определения ГМО, принадлежащего к целевому таксону, может быть проведен специфический контроль для целевого таксона. Он может быть обоснован, когда ДНК экстрагирована из композитного или подвергнувшегося глубокой обработке материала.

ДНК, экстрагированная из каждой части исследуемого образца, должна быть проанализирована не менее двух раз.

Виды контроля – в соответствии с ISO 24276, таблица 1.

7.2 Стабильность целевой последовательности

Для сортов различного географического и филогенетического происхождения должны быть приняты во внимание аллельная стабильность и число копий гена целевой последовательности.

7.3 Калибровка анализа

Должно быть применено соответствующее число калибровочных точек и повторений, охватывающих диапазон количественного определения [например, четыре калибровочные точки в двух повторениях (всего 4 × 2 значения) или шесть калибровочных точек с одним измерением в каждой точке (всего 6 значений)]. Качество калибровки влияет на погрешность измерения [9].

В качестве альтернативы эталонного материала геномной ДНК для калибровки может использоваться ряд разбавлений плазмиды или синтетической двухцепочечной ДНК, содержащих целевую последовательность, при условии, что результаты калибровки с их использованием сопоставимы с результатами, полученными при калибровке с использованием эталонного материала геномной ДНК и геномной ДНК, экстрагированной из образца.

7.4 Рассмотрение количественного определения

Методы ПЦР должны быть соответствующим образом разработаны с целью минимизации изменчивости.

Примечание – В зависимости от применяемого метода и/или анализируемого материала присутствие конструкций, включающих несколько целевых генов, может привести к преувеличению истинного содержания ГМО.

Для определения предела количественного определения (LOQ) см. ISO 24276.

На расчет содержания ГМО, основанный на числе копий целевых последовательностей в гаплоидном геноме, влияет гомо- и гетерозиготность изучаемых образцов. Более подробная информация приведена в приложениях A – D.

Применение метода $\Delta\Delta C_t$ (порогового цикла) обосновано только в том случае, если эффективность амплификации пробы, специфической для целевого таксона, и пробы, специфической для ГМО, очень близка.

7.5 Требования к обеспечению качества

Для получения достоверных оценок количества целевой последовательности желательна согласованность между измерениями. Однако для установления достоверности изменений необходимо знание относительного стандартного отклонения воспроизводимости метода (подробности см. в ISO серии 5725). Для расчета относительного стандартного отклонения воспроизводимости число отдельных измерений на лабораторный образец может превышать то, что допустимо на практике в приемлемых ценах. Следовательно, если наличие указанной, происходящей из ГМО ДНК (в процентах) запротоколировано, возможное решение требует как минимум:

a) согласовать в пределах части исследуемого образца:

– через отбраковку измерений меньших, чем предел количественного определения;

– через максимальное отклонение, наблюдаемое между разбавлениями и индивидуальными измерениями, равное ожидаемой величине, исходя из соответствующего фактора разбавления, ±33 %;

b) согласовать между рабочими частями образца:

– определенные относительные концентрации происходящей из ГМО ДНК, полученные с учетом пункта a), для каждой части исследуемого образца не должны различаться на значение более чем от минус 50 % до +100 % значения определенного количества (ΔC_t = 1 при ПЦР в реальном времени) (т. е. для двух рабочих частей образца приемлемы результаты измерений 1,0 % и 2,0 %, в то время как 0,9 % и 2,1 % неприемлемы).

Для того чтобы гарантировать точность измерений, для количества исследуемого события должен выбираться и анализироваться эталонный материал, предпочтительно сертифицированный, с соответствующим уровнем метрологической надежности и с надлежащим сходством вещества продукта. В отсутствие СЭМ может быть приготовлен эталонный материал собственного производства с помощью процедуры, обеспечивающей стабильность, однородность и единство измерений и гарантирующей отсутствие систематической погрешности. Количественно оцененная погрешность должна удовлетворять требованиям для калибровки (см. ISO Guide 32).

8 Оценка

Результаты ПЦР могут быть:

a) пригодными для количественной оценки целевой последовательности при условии, что:

– результат положительный в соответствии с ISO 21569:2005 (8.1);

– наблюдаемое ингибирование реакции незначительно;

– аналитические процедуры дают недвусмысленные величины измерений;

– количество целевой последовательности находится в пределах динамического диапазона метода;

– проведена калибровка аналитической процедуры соответствующим образом (см. 7.3).

b) непригодными для количественной оценки целевой последовательности, если любое из вышеперечисленных условий не было соблюдено.

Погрешность измерения должна быть достаточно мала, для того чтобы лаборатория могла дать обоснованное заключение.

В приложениях A – D описаны измерения количества целевой ДНК. Эти количества могут быть использованы для расчета количества ГМО. Эти расчеты обычно принимают во внимание такие относящиеся к делу биологические факторы, как гомо- и гетерозиготность целевых последовательностей.

Если количество целевой ГМ-последовательности или последовательности, специфической для целевого таксона, ниже предела количественного определения, результат должен выражаться только качественно.

Примечание – Утверждение, что количество происходящей из ГМО ДНК ниже предела количественного определения, сопровождающееся спецификацией этого предела количественного определения, рассматривается как качественное выражение результата.

9 Выражение результата

Результаты должны ясно констатировать количество целевой ГМ-последовательности относительно последовательности, специфической для целевого таксона.

Результаты должны также содержать значения погрешности измерения, такие как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение. Кроме того, должны приводиться значения предела обнаружения и предела количественного определения метода и фактические пределы обнаружения и количественного определения.

Целевая последовательность может быть, а может и не быть обнаружена или количество по крайней мере одной из них может быть ниже предела количественного определения. В таблице 1 указаны четыре альтернативных случая и соответствующее им выражение результата, которые должны быть включены в отчет по испытанию.

Таблица 1 – Выражение результатов

Результат	Выражение результата
Последовательность, специфическая для целевого таксона, не обнаружена	См. ISO 21569. «Для вида *X* ДНК не обнаружена»
Последовательность, специфическая для целевого таксона, обнаружена, но не обнаружена целевая последовательность, происходящая из ГМО	В соответствии с ISO 21569. «Для вида *X* ДНК, происходящая из ГМО, не обнаружена». В надлежащих случаях, кроме того, добавляется «Фактический предел обнаружения составляет *X* %» (указываются использованные единицы)

Окончание таблицы 1

Результат	Выражение результата
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая последовательность, происходящая из ГМО, однако количество по крайней мере одной из целевых последовательностей ниже предела количественного определения	Для каждого ГМО констатируется: «ДНК, происходящая из ГМО (специфический ГМО), обнаружена с помощью (специфическая целевая последовательность), полученной из (специфический вид)». В соответствующих случаях, кроме того, добавляется «Фактический предел количественного определения составляет *X* %» (указываются использованные единицы)
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая последовательность, происходящая из ГМО, и количество обеих целевых последовательностей выше предела количественного определения	Для каждого ГМО констатируется: «Содержание ДНК, происходящей из ГМО (специфический ГМО), обнаруженной с помощью (специфическая целевая последовательность), полученной из (специфический вид), составляет *X* ± погрешность %» (указываются использованные единицы)

Может также указываться содержание ДНК, происходящей из ГМО, с учетом погрешности измерения, как в том случае, когда оно превышает конкретную величину и когда не достигает ее.

10 Отчет об испытании

Отчет об испытании должен быть написан в соответствии с ISO 24276 и ISO 21569 и должен содержать по крайней мере следующую дополнительную информацию:

a) предел количественного определения метода и материал, с помощью которого он был установлен;

b) фактический предел количественного определения;

c) ссылку на метод, который был использован для экстракции ДНК;

d) ссылку на использованные материалы;

e) результаты, выраженные в соответствии с разделом 9.

Приложение А
(справочное)

Методы специфического целевого таксона

А.1 Метод специфического целевого таксона для определения абсолютного количественного содержания ДНК гена *adh*1 из кукурузы с использованием метода ПЦР в реальном времени

А.1.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и количественного определения (вспомогательного) гена *adh*1 (кодирующего алкогольдегидрогеназу 1) из кукурузы (*Zea mays*) для определения содержания ДНК-кукурузы или для тестирования присутствия/отсутствия в растворах ДНК, экстрагированной из продуктов, содержащих ДНК-кукурузу, например из пищевых продуктов, обнаруженных количеств ингибиторов ПЦР.

Ограничения см. в А.1.8.

А.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

А.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для ДНК, экстрагированной из чистых размолотых кукурузных зерен, листьев кукурузы и СЭМ (серий IRMM-411, IRMM-412, IRMM-413 [10]) [11].

Воспроизводимость описанного метода была проверена с помощью межлабораторных испытаний с использованием неизвестных образцов (U1 – U6), состоящих из ДНК-кукурузы дикого типа с различным числом копий соответствующей целевой последовательности (см. А.1.2.2), а также других межлабораторных испытаний в комбинации с методами специфического события ГМ-кукурузы, например Bt11 (см. D.1).

Число копий целевой последовательности на гаплоидный геном должно быть равно 1 [11].

Должна быть установлена аллельная стабильность целевой последовательности [11].

А.1.2.2 Межлабораторные испытания

Подтверждение достоверности (валидация) метода было проведено в ходе межлабораторных испытаний, организованных объединенным исследовательским центром Еврокомиссии (EC-JRC) и институтом защиты здоровья и потребителей (IHCP) в соответствии с международным протоколом гармонизации [12].

Для построения калибровочной кривой для определения абсолютного количества гаплоидных геномов кукурузы в неизвестных образцах были использованы шесть образцов (S1 – S6) ДНК-кукурузы дикого типа (экстрагированной из материала листьев [13]), содержащей известное абсолютное число копий (183 486, 61 162, 20 387, 6 796, 2 265 и 755) гаплоидных геномов кукурузы. Абсолютное число копий в известных образцах было определено путем деления массы ДНК (определенной методом флуориметрического количественного определения двухцепочечной ДНК фирмы PicoGreen, Molecular Probes, Cat. Number P-7589) на справочное среднее значение 1С для геномов кукурузы (2,725 пг) [14].

Шесть образцов (U1 – U6) ДНК-кукурузы дикого типа (экстрагированной из материала листьев [13]) были использованы в качестве неизвестных образцов. Ожидаемое число копий в неизвестных образцах было определено тем же методом, что и в известных образцах.

Результаты подтверждения достоверности метода, полученные в ходе межлабораторных испытаний, суммированы в таблице А.1.

Валидация метода была также проведена в комбинации с методами специфического события для нескольких образцов ГМ-кукурузы, например для сладкой кукурузы Bt11. Подробности комбинированных испытаний (относительного количественного определения) см. в [15] и [16], а также в D.1.

Таблица А.1 – Данные валидации

	Образец					
	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Количество участвовавших лабораторий, шт.	12	12	12	12	12	12
Количество лабораторий, имевших возвратные результаты, шт.	10	10	10	10	10	10
Количество исключенных лабораторий, шт.	1	1	1	1	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	9	9	9	9	9	9
Количество образцов на лабораторию, шт.	4	4	4	4	4	4
Число выбросов по тесту Кохрана	1	1	1	1	–	–
Число выбросов по тесту Граббса	–	1	1	1	1	1
Количество принятых образцов, шт.	35	34	34	34	35	35
Значение ожидаемого числа копий	7 339	18 349	36 697	55 046	91 743	146 788
Среднее значение числа копий	9 985	23 885	46 918	75 161	100 541	122 080
Отклонение от истинного значения, %	36,1	30,2	27,9	36,5	9,6	−16,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	1 318,59	1 463,60	5 796,58	4 539,57	11 306,89	14 843,41
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	13,21	6,13	12,35	6,04	11,25	12,16
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	2 013,12	2 083,57	6 145,39	6 806,85	14 592,04	17 777,70
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	20,16	8,72	13,10	9,06	14,51	14,56

[a] Выражается как значение числа копий.
[b] Выражается как процент от среднего значения.

А.1.2.3. Молекулярная специфичность

А.1.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой части последовательности, описанной в EMBL/GenBank/DDBJ [2)], регистрационный номер X04050. Эта последовательность является уникальной для *Zea mays* (кукуруза/маис) и *Zea mays* subsp. *diploperennis* (теосинте мексиканского) [11].

А.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных EMBL/GenBank/DDBJ [2)] с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN [2)] на сайте gost.e-ecolog.ru
[9 октября 2003 г.]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

А.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Специфичность метода была проверена в отношении широкого диапазона нецелевых таксонов и 20 различных линий кукурузы, представляющих географическое и филогенетическое разнообразие образцов [11]. Не было обнаружено перекрестной реактивности с нецелевыми таксонами (за исключением теосинте мексиканского *Zea mays* subsp. *diploperennis*, дикого предка культурной кукурузы) [11], [17]. Были установлены число копий и аллельная стабильность целевой последовательности у различных линий кукурузы [11].

[2)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация представлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

А.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для системы обнаружения последовательностей (далее – СОП) ABI PRISM 7700® [3] и TaqMan® chemistry [3]. Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [3].

А.1.2.5 Предел обнаружения (LOD)

В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOD составляет 10 копий целевой последовательности [11]. Наименьшее число копий целевой последовательности, включенных в межлабораторные испытания, составляло 7 399 копий целевой последовательности.

А.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOQ составляет 100 копий целевой последовательности [11]. Наименьшее число копий целевой последовательности, включенных в межлабораторные испытания, составляло 7 399 копий целевой последовательности.

А.1.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

А.1.4 Принцип метода

Фрагмент гена *adh*1 размером 134 пары оснований (далее – п. о.) амплифицировали с использованием двух кукурузных *adh*1-специфических праймеров (см. таблицу А.2). Накопление продуктов ПЦР измеряли в конце каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью кукурузного *adh*1-специфического олигонуклеотидного зонда (ADH1-MDO, см. таблицу А.2), помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [3].

Измеренный сигнал флуоресценции пересекал определяемое пользователем пороговое значение после нескольких циклов. Количество этих циклов было названо C_t-значением. Для количественной оценки количества кукурузной *adh*1-ДНК в неизвестном образце C_t-значение преобразовано в соответствующее значение числа копий путем сравнения с калибровочной кривой, чье C_t-значение напрямую связано с известным числом копий (регрессионный анализ).

А.1.5 Реактивы

А.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

А.1.5.2 Вода

А.1.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$) 10-кратный

А.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, *c* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

А.1.5.5 Раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов (далее – дНТФ), *c* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л (каждый)

А.1.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице А.2.

Таблица А.2 – Олигонуклеотиды

Наименование	Последовательность олигонуклеотидной ДНК	Окончательная концентрация при ПЦР
ADH-FF3	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'	300 нмоль/л
ADH- RR4	5'-CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'	300 нмоль/л
ADH1-MDO	5'-FAM-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCA-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ампликона *adh*1 составляет 134 п. о.

[3] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

А.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [4].

А.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

А.1.5.9 Реакционная смесь для амплификации

Подробно о реакционной смеси для амплификации см. в таблице А.3.

Таблица А.3 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (максимум 250 нг)		5 мкл
Taq-ДНК-полимераза	TaqMan® Universal Master Mix 2X	12,5 мкл
Деконтаминационная система (дУТФ, включая урацил-N-гликозилазу)		
Реакционный буфер (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]		
Смесь дНТФ		
Праймеры	См. таблицу А.2	См. А.1.5.6
Зонд	См. таблицу А.2	См. А.1.5.6
[a] ROX – карбокси-Х-родамин.		

А.1.6 Аппаратура

А.1.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

А.1.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль изначально был протестирован с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [5]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

А.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере реального времени, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [5].

А.1.7 Порядок проведения ПЦР

А.1.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности эталонного гена и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках, если иное не установлено в соответствующем приложении для ГМ-специфических целевых последовательностей.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблице А.3.

А.1.7.2 Контроль ПЦР

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля и/или эталонного материала для калибровки может быть использована высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из кукурузы (например, СЭМ от JRC, IRMM [5]) [13]. Должны быть проведены все виды контроля, установленные в ISO 24276.

---

[4] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[5] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

А.1.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице А.4, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [5]. В исследовании по подтверждению достоверности метода она использовалась совместно с AmpliTaq Gold® ДНК-полимеразой [5]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации фермента, зависит от особенностей используемой полимеразы. Условия реакции указаны в таблице А.4.

Таблица А.4 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (50 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

А.1.8 Ограничения и оценка результатов

Присутствие ингибиторов ПЦР может оказать сильное влияние на точность оценки числа копий *adh*1-последовательности в исследуемых образцах. Поэтому необходимо проверять присутствие или отсутствие обнаруженного количества ингибиторов ПЦР (см. также ISO 21571:2005, приложение А), например, путем проведения серии разбавлений ДНК-матрицы и проверки соответствия между разбавлениями и различиями величины C_t (порогового цикла), т. е. одной единице C_t соответствует удвоение концентрации ДНК-матрицы.

Для использования этого метода в комбинации с методом количественного определения происходящей из ГМО ДНК важно, чтобы абсолютное количество ДНК-матрицы (нг) было таким же, как при *adh*1-ПЦР, так и при ГМО-специфической ПЦР. Если это будет не так, то абсолютное число копий, полученное в ходе этих реакций, не может быть сравнено непосредственно и будет необходимо приведение этих чисел в соответствие. В противном случае относительная концентрация ГМО не может быть рассчитана.

А.1.9 Калибровка и результаты расчетов

Калибровочные точки получают с ДНК, содержащей определенное количество (в абсолютных числах копий) гаплоидной геномной ДНК-кукурузы, включающей целевую последовательность.

Калибровочную кривую получают путем построения графика значений C_t против логарифма числа копий целевой последовательности для калибровочной точки. Это может быть осуществлено, например, путем использования программного обеспечения (электронной таблицы), такого как Microsoft Excel [6], или напрямую с помощью опций, доступных в программном обеспечении СОП.

Калибровочную кривую используют для определения абсолютного числа гаплоидных копий генома кукурузной ДНК неизвестных образцов. Несмотря на то, что ДНК образца может быть деградирована вследствие процесса приготовления продукта либо может содержать иные ингредиенты, чем кукуруза, это не будет влиять на рассчитываемое число гаплоидных копий генома неизвестных образцов.

[6] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Приложение В
(справочное)

Методы скрининга

В.1 Метод скрининга для определения относительного количественного содержания ДНК 35S-промотора сои линии GTS 40-3-2 с использованием метода ПЦР в реальном времени

В.1.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и обнаружения таксон-специфического гена сои (ген лектина, *le*1) и ДНК 35S-промотора, происходящего из вируса мозаики цветной капусты, количественного определения содержания ДНК 35S-промотора в соевых ингредиентах, содержащих ГМ-сою линии GTS 40-3-2 (Roundup Ready®).

Ограничения см. в В.1.8.

В.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

В.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для СЭМ (СЭМ IRMM-410) [7)] [18], состоящих из высушенной муки соевых бобов, включающих смеси сои GTS 40-3-2 и обычной сои.

Воспроизводимость описанных методов была проверена в ходе межлабораторных испытаний с использованием неизвестных образцов (образцы, помеченные как SA – SE, см. в таблице В.1), состоящих из смеси эталонных материалов вышеперечисленного типа [19]. Кроме того, были протестированы доступные пищевые продукты [20].

Число копий каждой из целевых последовательностей на геном подробно оценено не было [21], [22].

Метод был опубликован в [23].

В.1.2.2 Межлабораторные испытания

Пять неизвестных образцов, содержащие от 0,7 % до 3 % (по массе) высушенной соевой муки из сои GTS 40-3-2, были проанализированы одиннадцатью участниками.

Метод, специфичный для обнаружения 35S-промотора, дал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 17 % до 34 % (см. таблицу В.1). В ходе начальных экспериментов межлабораторных испытаний было определено, что 1%-ный соевый СЭМ не соответствовал заявленной величине.

Исследования показали, что различавшиеся эталонные материалы были изготовлены разными способами в разное время, что и привело к разному уровню деградации ДНК. Участники межлабораторных испытаний были поставлены в известность о необходимости в ходе этого совместного испытания применять 2%-ный СЭМ и разбавлять его для получения раствора 1%-ной эталонной ДНК для использования при количественном определении.

Для экстракции ДНК использовалась процедура, приведенная в [23]. 200 нг материала образца было лизировано в 1 мл буфера [гуанидингидрохлорид//протеиназа К (0,5 моль/л//0,8 мг/мл)] при 56 °С в течение 3 ч. После стадии обработки РНКазой 500 мкл очищенного экстракта смешивалось с 1 мл силикогелевой смолы Wizard® [8)] и смола со связанной ДНК была пропущена через колонку с фильтром Wizard® [8)]. После промывания изопропанолом ДНК элюировали из силикогелевой смолы в 10 ммоль/л Трис-буфером pH 9,0 при 70 °С. Концентрацию ДНК определяли измерением оптической плотности при 260 нм и приводили к уровню 20 мкг/мл. Для последующего ПЦР-анализа 200 нг ДНК из каждого образца было проанализировано в двух независимых реакциях.

[7)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[8)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Каждый образец анализировался дважды.

Поскольку образцы, помеченные SA – SE, представляли собой смеси этих различных эталонов, результаты, полученные с помощью этих образцов, не могут быть использованы для оценки истинности предложенного метода ПЦР в реальном времени. Однако эти результаты могут быть использованы для оценки точности этих методов, в силу чего описанные обстоятельства отражают наихудший сценарий, ведущий к недооценке точности прикладного метода ПЦР в реальном времени [19].

Исключение лабораторий основано на использовании приборов ПЦР в реальном времени и на статистическом расчете выбросов. Метод был разработан для блочных термоциклеров. Поэтому две лаборатории, использовавшие системы LightCycler® [8)], были исключены еще до расчета выбросов. Исключение определенных приборов для ПЦР обусловлено тем, что прикладной метод нуждается в тщательной адаптации и оптимизации в том случае, если он проводится на приборе для ПЦР в реальном времени, отличном от того, который поименован в методе. Оставшиеся лаборатории были, кроме того, проверены на выбросы по Граббсу [24]. Однако не было обнаружено ни одного выброса. Подробности межлабораторных испытаний приведены в таблице В.1.

Таблица В.1 – Данные валидации 35S-промотор-специфического обнаружения ГМО

	Образцы				
	SA	SB	SC	SD	SE
Год проведения межлабораторных испытаний	1999	1999	1999	1999	1999
Количество лабораторий, имевших возвратные результаты, шт.	11	11	11	11	11
Количество образцов на лабораторию, шт.	1	1	1	1	1
Количество исключенных лабораторий, шт.	2	2	2	2	2
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	9	9	9	9	9
Количество принятых образцов, шт.	9	9	9	9	9
Ожидаемое значение, % ГМО	1,4	1,8	3	0,7	1
Среднее значение, % ГМО	1,63	1,76	4,04	0,88	1,73
Среднее линейное значение, % ГМО	1,62	1,70	3,46	1,00	1,60
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, % ГМО	0,28	0,39	1,36	0,21	0,35
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	17	22	34	24	20
Предел воспроизводимости R (R = 2,8 s_R)	0,80	1,08	3,82	0,58	0,97

Кроме того, четырьмя участниками межлабораторных испытаний были проанализированы четыре неизвестных доступных образца пищевой продукции, содержащей от 0,3 % до 36 % (по массе; средние значения) ГМ-сои линии GTS 40-3-2. Метод, специфический для обнаружения 35S-промотора, показал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 17 % до 28 % [20].

В.1.2.3 Молекулярная специфичность

В.1.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой части последовательности, описанной, например, в GenBank® [9)], регистрационный номер V00141.

Список ГМ-растений, содержащих CaMV 35S-промотор, приведен в [25].

Может быть получен ложноположительный результат вследствие того, что амплифицированная последовательность происходит из цветной капусты и других представителей сем. *Brassicaceae* (*Cruciferae*), а также *Resedaceae* и *Solanaceae*, инфицированных вирусом мозаики цветной капусты [26], [27], поэтому положительные результаты, касающиеся *Brassicaceae*, *Resedaceae* и *Solanaceae*, должны тщательно рассматриваться. Положительные результаты могут указывать на присутствие продуктов, происходящих из ГМ-растений, но не должны интерпретироваться как доказательство присутствия продуктов, происходящих из ГМ-растений, без дополнительного подтверждения.

Для того чтобы отличить вирусную инфекцию от ГМ-материала, могут использоваться методы обнаружения вируса мозаики цветной капусты [28].

[9)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

B.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ [9] с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [9] [24 апреля 2002 г.]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

B.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Экспериментальная специфичность метода оценена путем анализа СЭМ IRMM-410 из высушенной соевой муки производства IRMM, содержащей от 0 % до 5 % сои линии GTS 40-3-2, и эталонного материала фирмы Leatherhead Food Research Association International [9] – цельной соевой муки (Lot №. 2/99-01), содержащей 0 %, 0,3 %, 1,25 % и 2 % сои линии GTS 40-3-2 соответственно.

Исследованным коммерческим пищевым материалом были соевая мука, белковые изоляты сои, композитные пищевые продукты, содержащие соевую муку и соевый белок.

B.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для СОП ABI PRISM 7700® [9] и TaqMan® chemistry [9].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [9].

B.1.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Поскольку метод является количественным, LOD прямо не оценивался. LOD должен быть больше или равным пределу количественного определения, т. е. 50 копий генома сои линии GTS 40-3-2 в 82 000 копий генома обычной соевой муки.

B.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

LOQ был определен путем измерения серии разбавлений целевой ДНК, как описано в [20]. В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOQ составляет 50 копий генома сои линии GTS 40-3-2 в 82 000 копий генома обычной соевой муки. Значение 1C см. в [20]. В соответствии с этими данными оцененный относительный LOQ составляет 0,06 (= 50 копий/82 000 копий × 100 %).

Концентрации, исследованные в межлабораторных испытаниях, приведены в таблице B.1.

Примечание – Число копий в межлабораторных испытаниях не определялось.

B.1.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

B.1.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности CaMV 35S-промотора размером 82 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР двух 35S-промотор-специфических праймеров. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью 35S-промотор-специфического олигонуклеотидного зонда, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [10].

Фрагмент последовательности гена лектина сои размером 81 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для гена соевого лектина, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зондов, специфических для гена соевого лектина, производства TaqMan® [10].

Количественное определение производили с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ или метода двойной калибровочной кривой (см. B.1.9).

B.1.5 Реактивы

B.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (6.6).

[10] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

В.1.5.2 Вода

В.1.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$) 10-кратный

В.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, *c* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

В.1.5.5 Раствор дНТФ, *c* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л (каждый)

В.1.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице В.2.

Таблица В.2 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность эталонного гена		
Лектин-F	5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3'	900 нмоль/л
Лектин-R	5'-ggC ATA gAA ggT gAA gTT gAA ggA-3'	900 нмоль/л
Лектин-TMP	5'-FAM-AAC Cgg TAg CgT TgC CAg CTT Cg-TAMRA-3' [a]	100 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
35S-F	5'-gCC TCT gCC gAC AgT ggT-3'	300 нмоль/л
35S-R	5'-AAg ACg Tgg TTg gAA CgT CTT C-3'	900 нмоль/л
35S-TMP	5'-FAM-CAA AgA Tgg ACC CCC ACC CAC g-TAMRA-3' [a]	100 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер лектинового ПЦР-продукта составляет 81 п. о.; размер 35S-ПЦР-продукта составляет 82 п. о.

В.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [11)].

В.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

В.1.6 Аппаратура

В.1.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

В.1.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль изначально был протестирован с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) и СОП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems) [11)]. Могут использоваться другие системы СОП ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

В.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [11)].

В.1.7 Порядок проведения ПЦР

В.1.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности эталонного гена и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 50 мкл и реактивами, список которых приведен в таблице В.3.

[11)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица В.3 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации (на одну реакционную пробирку)

Целевая последовательность эталонного гена		
Общий объем		50 мкл
ДНК-матрица (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	5 ммоль/л
Праймеры	Лектин-F и лектин-R (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	Лектин-TMP (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
Целевая последовательность ГМО		
Общий объем		50 мкл
ДНК-матрица (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	5 ммоль/л
Праймеры	35S-F и 35S-R (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	35S-TMP (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
[a] ROX – карбокси-Х-родамин.		

В.1.7.2 Контроль ПЦР

В качестве положительного контроля и эталонного материала для калибровки могут быть использованы СЭМ GTS 40-3-2 (материалы, содержащие от 0,1 % до 5 % ГМ-сои), производимые IRMM, Гиль, Бельгия (серии IRMM-410) [12] [18].

Должны быть проведены все виды контроля, установленные в ISO 24276.

В.1.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице В.4, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [12]. В исследовании по подтверждению достоверности метода она использовалась совместно с AmpliTaq Gold® ДНК-полимеразой [12]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации фермента, зависит от особенностей используемой полимеразы.

Условия реакции указаны в таблице В.4.

Таблица В.4 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

[12] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

В.1.8 Ограничения и оценка результатов

Поскольку ГМО, отличные от сои линии GTS 40-3-2, содержат последовательность ДНК 35S-промотора, метод пригоден только для количественного определения ДНК-сои линии GTS 40-3-2 при отсутствии ГМО, отличных от сои GTS 40-3-2. Во всех других случаях метод может быть применен только для скрининга и контроля.

Приведенный метод пригоден для измерения соотношения ДНК 35S-промотора и ДНК-сои в отсутствие других ГМО и вируса мозаики цветной капусты. Это соотношение отражает количество сои линии GTS 40-3-2 в соевом ингредиенте исследуемого пищевого продукта. Содержание 1 % сои линии GTS 40-3-2 может быть определено, если количество соевого ингредиента в исследуемом пищевом продукте превышает 5 %.

Примечание – Если обработка пищевого продукта в ходе его приготовления привела к деградации или удалению ДНК (например, при получении рафинированного соевого масла или рафинированных соевых лецитинов), приведенный метод не дает достоверных результатов.

В.1.9 Калибровка и расчет результатов

После определения порогового значения [например, от 0,01 до 0,1 нормализованной флуоресценции репортерного красителя (Rn)] система обнаружения последовательностей рассчитывает значения C_t (порогового цикла) для каждой ПЦР (метод $\Delta\Delta C_t$). Рассчитываются различия между 35S-специфическим и лектин-специфическим значениями C_t образцов ($\Delta C_{t,обр}$) и эталонных образцов ($\Delta C_{t,эт}$). Относительное количество 35S-ДНК в образце w, %, относительно эталонного материала рассчитывается по формуле

$$w = 2^{-(\Delta C_{t,обр} - \Delta C_{t,эт})} \times c_{эт}, \qquad (B.1)$$

где $c_{эт}$ – концентрация эталонного образца.

Альтернативным образом калибровочная кривая рассчитывалась (log [c] относительно C_t) системой обнаружения последовательностей на основе эталонов, состоящих из смесей ГМО известных концентраций ГМ-сои линии GTS 40-3-2 (например, 0,1 %; 0,5 %, 1 %; 2 % и 5 %) или эталонов, состоящих из подходящих разбавлений эталонных растворов, полученных из смесей ГМО с определенной концентрацией сои линии GTS 40-3-2 (например, 5 %) – метод двойной калибровочной кривой. Эта калибровочная кривая применяется для определения концентрации сои линии GTS 40-3-2 в неизвестном образце. Поскольку ДНК образца может быть деградирована вследствие процесса приготовления пищевого продукта или из-за того, что образец может содержать иные ингредиенты, чем соевые бобы, рассчитанная концентрация GTS 40-3-2 должна быть нормализована в соответствии с количеством амплифицируемой ДНК-сои, присутствующей в образце. Это количество определяется с помощью ПЦР в реальном времени, специфической для гена соевого лектина, с использованием в качестве эталонной ДНК смесей ДНК определенной концентрации (например, 100 %, 50 %, 25 %, 10 % и 1 % по массе) ДНК-сои из серии IRMM 410, разбавленных подходящим ДНК-носителем. Для нормализации измеренное количество ДНК-сои линии GTS 40-3-2 делится на измеренное количество ДНК-сои.

При использовании альтернативной процедуры для расчета результатов важно, чтобы абсолютное количество ДНК-матрицы (нг) было одинаковым для каждой ПЦР, использованной для калибровки.

Другая альтернативная процедура описана в С.2.

Приложение С
(справочное)

Методы специфической конструкции

С.1 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 с использованием ПЦР в реальном времени (метод 1)

С.1.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и обнаружения таксон-специфического гена сои (ген лектина, *le*1) и ДНК, происходящей из специфической генной конструкции, присутствующей в ГМ-сое линии GTS 40-3-2. Метод пригоден для количественного определения ДНК, происходящей из ГМ-сои линии GTS 40-3-2, в соевых ингредиентах, содержащих ГМ-сою линии GTS 40-3-2 (Roundup Ready® [13]).

Ограничения см. в С.1.7.

С.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для СЭМ (СЭМ IRMM-410 [13]) [18], состоящих из высушенной муки соевых бобов, включающих смеси сои GTS 40-3-2 и обычной сои.

Воспроизводимость описанных методов была проверена в ходе межлабораторных испытаний с использованием неизвестных образцов (образцы, помеченные как SA – SE, см. в таблице С.1), состоящих из смеси эталонных материалов вышеперечисленного типа [19]. Кроме того, были протестированы доступные пищевые продукты [20].

Число копий каждой из целевых последовательностей на геном подробно оценено не было [21], [22].

Метод был опубликован в [23].

С.1.2.2 Межлабораторные испытания

Пять неизвестных образцов, содержащие от 0,7 % до 3 % (по массе) высушенной соевой муки из сои линии GTS 40-3-2, были проанализированы одиннадцатью участниками.

Метод, специфичный для обнаружения конструкции GTS 40-3-2, дал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 16 % до 28 % (см. таблицу С.1). В ходе начальных экспериментов межлабораторных испытаний было определено, что 1%-ный соевый СЭМ не соответствовал заявленной величине.

Исследования показали, что различавшиеся эталонные материалы были изготовлены разными способами в разное время, что и привело к разному уровню деградации ДНК. Участники межлабораторных испытаний были поставлены в известность о необходимости в ходе этого совместного испытания применять 2%-ный СЭМ и разбавлять его для получения раствора 1%-ной эталонной ДНК для использования при количественном определении.

Для экстракции ДНК использовалась процедура, приведенная в [23]. 200 нг материала образца было лизировано в 1 мл буфера [гуанидингидрохлорид//протеиназа К (0,5 моль/л//0,8 мг/мл)] при 56 °С в течение 3 ч. После стадии обработки РНКазой 500 мкл очищенного экстракта смешивалось с 1 мл силикогелевой смолы Wizard® [14] и смола со связанной ДНК была пропущена через колонку с фильтром Wizard® [14]. После промывания изопропанолом ДНК элюировали из силикогелевой смолы в 10 ммоль/л Трис-буфером pH 9,0 при 70 °С. Концентрацию ДНК определяли измерением оптической плотности при 260 нм и приводили к уровню 20 мкг/мл. Для последующего ПЦР-анализа 200 нг ДНК из каждого образца было проанализировано в двух независимых реакциях.

Каждый образец анализировался дважды.

---

[13] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[14] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Поскольку образцы, помеченные SA – SE, представляли собой смеси этих различных эталонов, результаты, полученные с помощью этих образцов, не могут быть использованы для оценки истинности предложенного метода ПЦР в реальном времени. Однако эти результаты могут быть использованы для оценки точности этих методов, в силу чего описанные обстоятельства отражают наихудший сценарий, ведущий к недооценке точности прикладного метода ПЦР в реальном времени [19].

Исключение лабораторий основано на использовании приборов ПЦР в реальном времени и на статистическом расчете выбросов. Метод был разработан для блочных термоциклеров. Поэтому две лаборатории, использовавшие системы LightCycler® [14] (Roche Diagnostics), были исключены еще до расчета выбросов. Исключение определенных приборов для ПЦР обусловлено тем, что прикладной метод нуждается в тщательной адаптации и оптимизации в том случае, если он проводится на приборе для ПЦР в реальном времени, отличном от того, который поименован в методе. Оставшиеся лаборатории были, кроме того, проверены на выбросы по Граббсу [24]. Однако не было обнаружено ни одного выброса. Подробности межлабораторных испытаний приведены в таблице С.1.

Таблица С.1 – Данные валидации 35S-промотор-специфического обнаружения ГМО

	Образцы				
	SA	SB	SC	SD	SE
Год проведения межлабораторных испытаний	1999	1999	1999	1999	1999
Количество лабораторий, имевших возвратные результаты, шт.	11	11	11	11	11
Количество образцов на лабораторию, шт.	1	1	1	1	1
Количество исключенных лабораторий, шт.	3	2	3	3	3
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	8	9	8	8	8
Количество принятых образцов, шт.	8	9	8	8	8
Ожидаемое значение, % ГМО	1,4	1,8	3	0,7	1
Среднее значение, % ГМО	1,70	1,89	3,65	0,86	1,58
Среднее линейное значение, % ГМО	1,71	1,90	3,68	0,85	1,49
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, % ГМО	0,27	0,53	0,57	0,15	0,38
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	16	28	16	17	24
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$)	0,77	1,48	1,60	0,42	1,06

Кроме того, четырьмя участниками межлабораторных испытаний были проанализированы четыре неизвестных, коммерчески доступных образца пищевой продукции, содержащей от 0,3 % до 36 % (по массе; средние значения) ГМ-сои линии GTS 40-3-2. Метод, специфический для обнаружения конструкции GTS 40-3-2, показал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 23 % до 36 % [20].

С.1.2.3 Молекулярная специфичность

С.1.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой части последовательности, описанной, например, в GenBank® [15], регистрационный номер AX033493.

С.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ [15] с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [15] [24 апреля 2002 г.]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

С.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Экспериментальная специфичность метода оценена путем анализа СЭМ IRMM-410 из высушенной соевой муки производства IRMM, содержащей от 0 % до 5 % сои линии GTS 40-3-2, и эталонного материала фирмы Leatherhead Food Research Association International [15] – цельной соевой муки (Lot № 2/99-01), содержащей 0 %, 0,3 %, 1,25 % и 2 % сои линии GTS 40-3-2 соответственно.

---

[15] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Исследованным коммерческим пищевым материалом были соевая мука, белковые изоляты сои, композитные пищевые продукты, содержащие соевую муку и соевый белок.

С.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для СОП ABI PRISM 7700® и TaqMan® chemistry [15)].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [15)].

С.1.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Поскольку метод является количественным, LOD прямо не оценивался. LOD должен быть лучше или равным пределу количественного определения, т. е. 50 копий генома сои линии GTS 40-3-2 в 82 000 копий генома обычной соевой муки.

С.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Предел количественного определения был определен путем измерения серии разбавлений целевой ДНК, как описано в [20]. В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOQ составляет 50 копий генома сои линии GTS 40-3-2 в 82 000 копий генома обычной соевой муки. Величину 1С см. в [20].

В соответствии с этими данными оцененный относительный LOQ составляет 0,06 (= 50 копий/ 82 000 копий × 100 %).

Концентрации, исследованные в межлабораторных испытаниях, приведены в таблице С.1.

Примечание – Число копий в межлабораторных испытаниях не определялось.

С.1.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.1.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности трансгена, использованного для конструирования сои линии GTS 40-3-2, размером 83 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР двух праймеров, специфических для гена CTP из *Petunia hybrida* (RRS-F, см. таблицу С.2) и 35S-промотору (RRS-R, см. таблицу С.2).

ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для соединения гена CTP и 35S-промотора (RRS-TMP, см. таблицу С.2). Этот олигонуклеотидный зонд помечен двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [16)].

Фрагмент последовательности гена лектина сои размером 81 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для гена соевого лектина, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зондов, специфических для гена соевого лектина, производства TaqMan® [16)] (Lectin-TMP, см. таблицу С.2).

Количественное определение производили с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ или метода двойной калибровочной кривой (см. С.1.8).

С.1.5 Реактивы

С.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.1.5.2 Вода

С.1.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$) 10-кратный

С.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, *с* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

С.1.5.5 Раствор дНТФ, *с* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л (каждый)

С.1.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице С.2.

[16)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.2 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность эталонного гена		
Лектин-F	5'-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3'	900 нмоль/л
Лектин-R	5'-ggC ATA gAA ggT gAA gTT gAA ggA-3'	900 нмоль/л
Лектин-TMP	5'-FAM-AAC Cgg TAg CgT TgC CAg CTT Cg-TAMRA-3' [a]	100 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
RRS-F	5'-gCC ATg TTg TTA ATT TgT gCC AT-3'	900 нмоль/л
RRS-R	5'-gAA gTT CAT TTC ATT Tgg AgA ggA C-3'	900 нмоль/л
RRS-TMP	5'-FAM-CTT gAA AgA TCT gCT AgA gTC AgC TTg TCA gCg-TAMRA-3' [a]	100 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер лектинового ПЦР-продукта составляет 81 п. о.; размер ПЦР-продукта RRS составляет 83 п. о.

С.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [17].

С.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

С.1.6 Аппаратура

С.1.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.1.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль изначально был протестирован с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [17] и СОП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems) [17]. Могут использоваться другие СОП ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [17].

С.1.6.4 Порядок проведения ПЦР

ПЦР для целевой последовательности эталонного гена и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 50 мкл и реактивами, список которых приведен в таблице С.3.

[17] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.3 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации (на одну реакционную пробирку)

Целевая последовательность эталонного гена		
Общий объем		50 мкл
ДНК-матрица (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	5 ммоль/л
Праймеры	Лектин-F и лектин-R (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	Лектин-TMP (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
Целевая последовательность ГМО		
Общий объем		50 мкл
ДНК-матрица (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	5 ммоль/л
Праймеры	RRS-F и RRS-R (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	RRS-TMP (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
[a] ROX – карбокси-Х-родамин.		

С.1.6.5 Контроль ПЦР

В качестве положительного контроля и эталонного материала для калибровки могут быть использованы СЭМ GTS 40-3-2 (материалы, содержащие от 0,1 % до 5 % ГМ-сои), производимые IRMM, Гиль, Бельгия (серии IRMM-410) [18)] [18].

Должны быть проведены все виды контроля, установленные в ISO 24276.

С.1.6.6 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.4, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [12)]. В исследовании по подтверждению достоверности метода она использовалась совместно с AmpliTaq Gold® ДНК-полимеразой [12)]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации фермента, зависит от особенностей используемой полимеразы.

Условия реакции указаны в таблице С.4.

Таблица С.4 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

[18)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.1.7 Ограничения и оценка результатов

Поскольку ГМО, отличные от сои линии GTS 40-3-2, могут содержать часть трансгена, использовавшегося для конструирования сои линии GTS 40-3-2, в частности 35S-промотор, CTP-последовательность из *Petunia hybrida* и специфическое соединение между этими двумя генетическими элементами, метод пригоден для количественного определения ДНК-сои линии GTS 40-3-2 при отсутствии других ГМО, как определено выше.

Приведенный метод пригоден для измерения соотношения ДНК из сои линии GTS 40-3-2 и ДНК обычной сои. Это соотношение отражает количество сои линии GTS 40-3-2 в соевом ингредиенте исследуемого пищевого продукта.

Если количество соевого ингредиента в исследуемом пищевом продукте превышает 5 %, маловероятно, что содержание 1 % сои линии GTS 40-3-2 может быть определено.

Примечание – Если обработка пищевого продукта в ходе его приготовления привела к деградации или удалению ДНК (например, при получении рафинированного соевого масла или рафинированных соевых лецитинов), приведенный метод не дает достоверных результатов.

С.1.8 Калибровка и расчет результатов

После определения порогового значения [например, от 0,01 до 0,1 нормализованной флуоресценции репортерного красителя (Rn)] система обнаружения последовательностей рассчитывает значения C_t (порогового цикла) для каждой ПЦР (метод $\Delta\Delta C_t$). Рассчитываются различия между RRS-специфическим и лектин-специфическим значениями C_t образцов ($\Delta C_{t,обр}$) и эталонных образцов ($\Delta C_{t,эт}$).

Относительное количество ДНК-сои линии GTS 40-3-2 в образце *w*, %, относительно эталонного материала рассчитывается по формуле

$$w = 2^{-(\Delta C_{t,обр} - \Delta C_{t,эт})} \times c_{эт}, \qquad (C.1)$$

где $c_{эт}$ – концентрация эталонного образца.

Альтернативным образом калибровочная кривая рассчитывалась (log [*c*] относительно C_t) системой обнаружения последовательностей на основе эталонов, состоящих из смесей ГМО известных концентраций ГМ-сои линии GTS 40-3-2 (например, 0,1 %; 0,5 %, 1 %; 2 % и 5 %) или эталонов, состоящих из подходящих разбавлений эталонных растворов, полученных из смесей ГМО с определенной концентрацией сои линии GTS 40-3-2 (например, 5 %) – метод двойной калибровочной кривой. Эта калибровочная кривая применяется для определения концентрации сои линии GTS 40-3-2 в неизвестном образце. Поскольку ДНК образца может быть деградирована вследствие процесса приготовления пищевого продукта или из-за того, что образец может содержать иные ингредиенты, чем соевые бобы, рассчитанная концентрация сои линии GTS 40-3-2 должна быть нормализована в соответствии с количеством амплифицируемой ДНК-сои, присутствующей в образце. Это количество определяется с помощью ПЦР в реальном времени, специфической для гена соевого лектина, с использованием в качестве эталонной ДНК смесей ДНК определенной концентрации (например, 100 %, 50 %, 25 %, 10 % и 1 % по массе) ДНК-сои из серии IRMM 410 или 410R [19)], разбавленных подходящим ДНК-носителем. Для нормализации измеренное количество ДНК-сои линии GTS 40-3-2 делится на измеренное количество ДНК-сои.

При использовании альтернативной процедуры для расчета результатов важно, чтобы абсолютное количество ДНК-матрицы (нг) было одинаковым для каждой ПЦР, использованной для калибровки.

Другая альтернативная процедура описана в С.2.

С.2 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 с использованием ПЦР в реальном времени (метод 2)

С.2.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и обнаружения таксон-специфического гена сои (ген лектина, *le*1) и специфического участка генной конструкции – места соединения ДНК 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты и хлоропластного сигнала *Petunia hybrida*, предшествующего последовательности гена 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазы

[19)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Agrobacterium (epsps), присутствующего в ГМ-сое линии GTS 40-3-2 (Roundup Ready® [20]) для количественного определения относительного количества ДНК, происходящей из ГМ-сои линии GTS 40-3-2.

Ограничения см. в С.2.8.

С.2.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.2.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для приборов для ПЦР в реальном времени с использованием СЭМ (СЭМ IRMM-410R [20]) [18], состоящих из высушенной муки соевых бобов, включающих смеси сои линии GTS 40-3-2 и обычной сои.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием неизвестных образцов, состоящих из вышеупомянутых эталонных материалов. Кроме того, были протестированы обработанные эталонные материалы текстурированного растительного белка (далее – ТРБ).

Число копий каждой из целевых последовательностей на геном подробно оценено не было.

С.2.2.2 Межлабораторные испытания

Шесть неизвестных образцов, содержащие от 0,1 % до 5 % (по массе) вышеупомянутых СЭМ (СЭМ IRMM-410R [20]) и ТРБ, содержащего 2 % (по массе) сои линии GTS 40-3-2, были проанализированы:

– 14 лабораториями, использовавшими СОП ABI PRISM® 7700;

– 6 лабораториями, использовавшими СОП ABI GeneAmp® 5700;

– 12 лабораториями, использовавшими систему LightCycler® [20] (Roche Diagnostics).

Количество участников и образцов – в соответствии с ISO 5725.

Система специфической конструкции GTS 40-3-2 дала относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 27 % до 44 % при использовании аппаратов СОП ABI PRISM® 7700 и СОП ABI GeneAmp® 5700 соответственно и в диапазоне от 27 % до 64 % при использовании LightCycler® [20] (Roche Diagnostics).

Для экстракции ДНК использовалась процедура, приведенная в ISO 21571:2005, А.3.

Для каждого образца параллельно анализировались два экстракта ДНК. Каждый исследуемый образец был проанализирован трижды.

Точность метода, достоверность и предел количественного определения определялись в ходе межлабораторных испытаний. Данные специфичности, линейности и пределов обнаружения и количественного определения были установлены до межлабораторных испытаний. Содержание ДНК в исследуемых образцах охватывало эти величины.

Данные валидации достоверности и точности приведены в таблицах С.5 и С.6.

Таблица С.5 – Данные валидации для СОП ABI PRISM® 7700 и СОП ABI GeneAmp® 5700 [21]

	Образец 1 0,10 % ± ± 0,03 %	Образец 2 0,50 % ± ± 0,06 %	Образец 3 1,0 % ± ± 0,1 %	Образец 4 2,0 % ± ± 0,2 %	Образец 5 5,0 % ± ± 0,2 %	Образец 6 2 % ТРБ
Год межлабораторных испытаний	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Количество участвовавших лабораторий, шт.	19	19	19	19	19	19
Число выбросов [a]	0	2	1	0	1	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов, шт.	19	17	18	19	18	19

[20] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[21] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Окончание таблицы С.5

	Образец 1 0,10 % ± ± 0,03 %	Образец 2 0,50 % ± ± 0,06 %	Образец 3 1,0 % ± ± 0,1 %	Образец 4 2,0 % ± ± 0,2 %	Образец 5 5,0 % ± ± 0,2 %	Образец 6 2 % ТРБ
Среднее значение, %	0,11	0,49	1,00	2,27	5,11	1,71
Стандартное отклонение повторяемости s_r	0,04	0,12	0,21	0,25	0,53	0,48
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	33	24	21	11	10	28
Предел повторяемости r (r = 2,8 s_r)	0,10	0,33	0,59	0,71	1,48	1,34
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R	0,05	0,3	0,28	0,71	1,38	0,55
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	44	27	28	32	27	32
Предел воспроизводимости R (R = 2,8 s_R)	0,13	0,37	0,77	2,00	3,87	1,54
[a] Выбросы были идентифицированы с помощью тестов Граббса и Кохрана [24].						

Таблица С.6 – Данные валидации для системы LightCycler® [22)]

	Образец 1 0,10 % ± ± 0,03 %	Образец 2 0,50 % ± ± 0,06 %	Образец 3 1,0 % ± ± 0,1 %	Образец 4 2,0 % ± ± 0,2 %	Образец 5 5,0 % ± ± 0,2 %	Образец 6 2 % ТРБ
Год межлабораторных испытаний	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Количество участвовавших лабораторий, шт.	7	7	7	7	7	5
Число выбросов [a]	1	0	0	0	0	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов, шт.	6	7	7	7	7	4
Среднее значение, %	0,13	0,55	0,95	2,01	5,43	1,82
Стандартное отклонение повторяемости s_r	0,07	0,23	0,28	0,56	1,10	0,20
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	55	42	30	28	20	11
Предел повторяемости r (r = 2,8 s_r)	0,19	0,66	0,79	1,57	3,07	0,56
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R	0,08	0,31	0,34	0,64	1,94	0,50
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	64	55	35	32	36	27
Предел воспроизводимости R (R = 2,8 s_R)	0,22	0,86	0,95	1,79	5,43	1,40
[a] Выбросы были идентифицированы с помощью тестов Граббса и Кохрана [24].						

[22)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Результаты, приведенные в таблице С.6, иллюстрируют изменчивость, наблюдавшуюся для системы LightCycler® [22] (Roche Diagnostics). Отмечается, что количество лабораторий, вернувших результаты, было недостаточным в соответствии с ISO 5725.

С.2.2.3 Молекулярная специфичность

С.2.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой части последовательности, описанной, например, в GenBank® [22], регистрационный номер AY596948.

С.2.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ [22] с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [22] [24 апреля 2002 г.]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

С.2.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Были идентифицированы СЭМ IRMM-410R [22] из высушенной соевой муки, содержащей от 0 % до 5 % сои линии GTS 40-3-2. Были протестированы такие пищевые материалы, как соевая мука и соевые белковые изоляты.

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторных систем к следующим нецелевым видам/образцам: рису (*Oryza sativa*), ржи (*Secale cereale*), пшенице (*Triticum aestivum*), ячменю (*Hordeum vulgare*), просу (*Panicum miliaceum*), чечевице (*Lens culinaris*), белой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), золотистой фасоли (*Phaseolus aureus*), желтому люпину (*Lupinus luteus*), теосинте мексиканскому (*Zea mays* ssp. *mexicana*), томату (*Lycopersicon esculentum*), картофелю (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*), сорго (*Sorghum vulgare*), кукурузе (*Zea mays*), рапсу (*Brassica napus*), овсу (*Avena sativa*), полбе (*Triticum spelta*), льну (*Linum usitatissimum*), гречихе (*Fagopyrum esculentum*), кунжуту (*Sesamum* sp.), человеку (*Homo sapiens sapiens*), лососю (*Salmo salar*), говядине (*Bos taurus*) и *Bacillus subtilis*. Более того, не обнаружено перекрестной реактивности с рапсом линии MS8×RF3 (SeedLink) или со следующими ГМ-сортами кукурузы Bt176, Bt11, T25, MON 810, CBH351, DBT418, GA21.

Аллельная стабильность и стабильность числа копий эталонного соевого гена оценена с использованием не менее восьми сортов сои.

С.2.2.4 Оптимизация

Оптимизация концентраций реактивов была проведена для СОП ABI PRISM 7700® и прибора LightCycler® с использованием TaqMan®chemistry [23] [3]. Никакой дополнительной оптимизации не производили для прибора GeneAmp® 5700, поскольку термоциклер в этом инструменте идентичен термоциклеру в ABI PRISM 7700® [23].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [23].

С.2.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Предел обнаружения в ходе межлабораторных испытаний не оценивался. LOD для ПЦР рассчитывался с помощью измерения серии разбавлений целевой ДНК. В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что LOD составлял пять копий целевой последовательности (определен с плазмидами).

С.2.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Предел количественного определения был определен путем измерения серии разбавлений целевой ДНК.

В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOQ составляет по крайней мере 50 копий генома сои линии GTS 40-3-2. Величину 1С см. в [20].

Концентрации, исследованные в межлабораторных испытаниях, приведены в таблицах С.5 и С.6.

Примечание – Число копий в межлабораторных испытаниях не определялось.

---

[23] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.2.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.2.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции сои линии GTS 40-3-2 размером 74 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием двух специфических праймеров GTS 40-3-2. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции сои линии GTS 40-3-2, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [23)].

Фрагмент последовательности таксон-специфического гена лектина сои (*le*1) размером 74 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для гена соевого лектина *le*1, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для гена *le*1, производства TaqMan® [23)].

Для количественного определения экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой.

Примечание – Перед количественным ПЦР-анализом растворы экстрагированной ДНК были проанализированы методом качественной ПЦР на приборе ПЦР в реальном времени. Качественный ПЦР-прогон («контрольный прогон») проводился для определения «порогового цикла» (значения C_t) каждого образца, для которого отсутствует экспериментальный опыт. Путем тестирования двух разных разбавлений экстрагированной нуклеиновой кислоты (например, разбавлений раствора ДНК 1 : 10 и 1 : 40) в ходе контрольного прогона можно обнаружить возможное присутствие ингибиторов амплификации. Кроме того, можно определить подходящее разбавление экстракта нуклеиновых кислот, полученного из исследуемого образца, которое попадает в калибровочный диапазон количественного анализа.

С.2.5 Реактивы

С.2.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.2.5.2 Вода

С.2.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$) 10-кратный

С.2.5.4 Раствор $MgCl_2$, *c* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

С.2.5.5 Раствор дНТФ, *c* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л

С.2.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице С.7.

Таблица С.7 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность эталонного гена		
GM1-F	5'-CCA gCT TCg CCg CTT CCT TC-3'	600 нмоль/л
GM1-R	5'-gAA ggC AAg CCC ATC TgC AAg CC-3'	600 нмоль/л
GM1-зонд	5'-FAM- CTT CAC CTT CTA TgC CCC TgA CAC-TAMRA-3' [a]	120 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
RR1-F	5'-CAT TTg gAg Agg ACA CgC TgA-3'	600 нмоль/л
RR1-R	5'-gAg CCA TgT TgT TAA TTT gTg CC-3'	600 нмоль/л
RR1-зонд	5'-FAM-CAA gCT gAC TCT AgC AgA TCT TTC-TAMRA-3' [a]	125 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер лектина и продуктов ПЦР GTS 40-3-2 составляет 74 п. о.

С.2.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [24].

С.2.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

С.2.6 Аппаратура

С.2.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.2.6.2 Термоциклер

Указанные температурно-временные профили первоначально были протестированы с прибором СОП ABI PRISM® 7700 или СОП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems) или системой LightCycler® (Roche Diagnostics) [25]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени, если они могут показать эквивалентные или лучшие результаты.

С.2.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны подходить для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) и капилляры LightCycler® (Roche Diagnostics) [25].

С.2.7 Порядок проведения ПЦР

С.2.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности эталонного гена и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Перед количественным прогоном проводили прогон ПЦР в реальном времени по крайней мере с двумя разбавлениями ДНК, экстрагированной из испытательных образцов для обеих ПЦР-систем для контроля амплифицируемости. Данные, полученные в ходе этого «контрольного прогона», использовали для контроля качества ДНК (ингибирования). Значения C_t, полученные из двух линейных разбавлений, должны быть пропорциональными определенному различию значений C_t (ΔC_t), например разбавление один к четырем приводит к значению ΔC_t, равному приблизительно 2. Меньшее значение ΔC_t указывает на нелинейную амплификацию, которая может быть вызвана ингибиторами ПЦР. Значение C_t неизвестной ДНК, определенное в ходе «контрольного прогона», дает также информацию о количестве целевой ДНК. Таким образом, выбирается подходящая концентрация ДНК неизвестного исследуемого образца, которая должна находиться в диапазоне эталонной кривой.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 50 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.8 и С.9.

---

[24] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[25] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.8 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности (на одну реакционную пробирку)

Общий объем		50 мкл
Добавленная ДНК-матрица (от 1,7 до 108 нг ДНК-сои)		5 мкл
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [a]	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [b]	1-кратный
	$MgCl_2$	4,5 ммоль/л
Праймеры	GM1-F и GM1-R (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	GM1 (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
H_2O (для молекулярной биологии)		Добавляется до 50 мкл

[a] В случае использования системы LightCycler® рекомендуется альтернативный буфер и Taq-полимераза, например Platinum Taq или FastStart Taq в реакционном буфере изготовителя.
[b] ROX – карбокси-Х-родамин.

Таблица С.9 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации целевой последовательности ГМО (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		50 мкл
Добавленная ДНК-матрица (от 1,7 до 108 нг ДНК-сои)		5 мкл
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [a]	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [b]	1-кратный
	$MgCl_2$	4,5 ммоль/л
Праймеры	RR1-F и RR1-R (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	RR1 (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
H_2O (для молекулярной биологии)		Добавляется до 50 мкл

[a] В случае использования системы LightCycler® рекомендуется альтернативный буфер и Taq-полимераза, например Platinum Taq или FastStart Taq в реакционном буфере производится.
[b] ROX – карбокси-Х-родамин.

С.2.7.2 Контроль ПЦР

В качестве положительного контроля могут быть использованы СЭМ ГМ-сои GTS 40-3-2, производимые IRMM, Гиль, Бельгия (серии IRMM-410) [26] [18].

Должны быть проведены все виды контроля, установленные в ISO 24276.

С.2.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.10, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) и системы LightCycler® (Roche Diagnostics) [26]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с ДНК-полимеразой AmpliTaq Gold® [26]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой полимеразы.

Условия реакции указаны в таблице С.10.

[26] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.10 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация (при необходимости)		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15 [a]/5 [b]	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60 [a]/25 [b]	60
[a] Оптимизировано для ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) с программным обеспечением версии 1.6.3. [b] Оптимизировано для системы LightCycler®. Параметры флуоресценции в LightCycler® – канал 1 (коэффициент усиления 4) и единичный сбор данных с программным обеспечением версии 3.			

С.2.8 Ограничения и оценка результатов

Поскольку ГМО, отличные от сои линии GTS 40-3-2, могут содержать часть генетической конструкции, использовавшейся для конструирования сои линии GTS 40-3-2, в частности специфическое соединение между 35S-промотором и CTP-сигнальной последовательностью из *Petunia hybrida*, метод пригоден для количественного определения ДНК-сои линии GTS 40-3-2 при отсутствии других ГМО, как определено выше.

Приведенный метод пригоден для измерения соотношения ДНК, специфической для сои линии GTS 40-3-2, и ДНК обычной сои. Это соотношение отражает количество сои линии GTS 40-3-2 в соевом ингредиенте исследуемого пищевого продукта.

Метод валидирован для соевой муки и текстурированного растительного белка.

Примечание – Если ДНК-соя была утрачена или сильно деградирована в ходе обработки пищевого продукта при его приготовлении (например, при получении рафинированного соевого масла) или если соя является только очень минорным компонентом анализируемого образца, количество соевого стандарта и/или ГМ-специфических копий будет на уровне или ниже предела количественного определения, описанные методы не будут применимыми.

С.2.9 Калибровка и расчет результатов

Отдельные калибровочные кривые для каждой системы «праймер – зонд» генерируются в ходе одного и того же аналитического амплификационного пробега. Калибровочные кривые включают четыре разбавления ДНК, экстрагированной из 5%-ного СЭМ IRMM-410R [27)]. В каждой из четырех калибровочных точек проводилось дублирующее СОП ABI PRISM® 7700 [27)] и СОП GeneAmp® 5700 [27)] или одиночное (система LightCycler®) [27)] определение. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, измеряли с помощью инструментов ABI, в то время как единичные определения с использованием двух различных разбавлений экстракта ДНК образца проводились с помощью системы LightCycler® [27)].

Калибровочная кривая получается путем построения графика значений C_t относительно логарифма числа копий целевой последовательности для калибровочных точек. Это может быть осуществлено, например, путем использования программного обеспечения (электронной таблицы), такого как Microsoft Excel, или напрямую с помощью опций, доступных в программном обеспечении СОП.

Число копий, измеренное для ДНК неизвестного образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества ДНК-сои линии GTS 40-3-2 в неизвестном образце число копий целевой последовательности GTS 40-3-2 делится на число копий гена *лектина* и умножается на 100, после чего выражается в процентах.

[27)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.3 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы Event176 с использованием ПЦР в реальном времени

С.3.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и обнаружения таксон-специфического гена кукурузы (*Zea mays*) – гена белка группы высокой подвижности (hmg) и специфического участка синтетического гена *cry1A(b)*, происходящего из *Bacillus thuringiensis* [синтетический *cry*1A(b)], присутствующего в геноме ГМ-кукурузы линии Event176 (Bt176; Maximizer™), для количественного определения относительного количества ДНК, происходящей из ГМ-кукурузы линии Event176.

Ограничения см. в С.3.8.

С.3.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.3.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для СЭМ (СЭМ IRMM-411 [28)]), состоящих из высушенной кукурузной муки, включающих смеси ГМ-кукурузы линии Event176 и обычной кукурузы.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием неизвестных образцов СЭМ IRMM-411 [28)], содержащих от 0,1 % до 5 % ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси с обычной кукурузой, а также с использованием эталонных материалов, полученных из термически стерилизованных зерен кукурузы (ТСЗ), содержащих 2 % ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси с обычной кукурузой.

Число копий каждой из целевых генов в расчете на геном подробно оценено не было.

С.3.2.2 Межлабораторные испытания

Межлабораторные испытания были организованы бывшим институтом защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV, ныне BfR, Германия) совместно с GeneScan Europe (Teltow, Германия). Количество участников и образцов – в соответствии с ISO 5725.

Исследование было проведено 10 лабораториями, использующими СОП ABI PRISM® 7700 [28)], и 7 лабораториями, использующими СОП GeneAmp® 5700 [28)].

Для экстракции ДНК использовалась процедура, приведенная в ISO 21571:2005 (А.3).

Для каждого образца две экстракции ДНК анализировались параллельно. Каждый исследуемый образец анализировался трижды.

Каждый участник получил шесть неизвестных образцов. Образцы состояли из четырех СЭМ: СЭМ IRMM-411, содержащих от 0,1 % до 2 % (по массе) ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси с обычной кукурузной мукой, образец кукурузной муки, состоящий из смеси (по массе) 50 % сои линии GTS 40-3-2 (Roundup ready), 49 % кукурузы, не модифицированной генетически, 1 % ГМ-кукурузы линии Event176 (помеченный как смесь А) и высушенный порошок, изготовленный из термически стерилизованных зерен (помеченный как ТСЗ), состоявший из смеси 2 % ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси с обычной кукурузной мукой.

Точность метода, достоверность и предел количественного определения определялись в ходе межлабораторных испытаний. Данные специфичности, линейности и пределов обнаружения и количественного определения, которые превосходили диапазон для испытательных образцов, были установлены до межлабораторных испытаний.

Результаты подтверждения точности и достоверности метода суммированы в таблице С.11.

[28)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.11 – Данные валидации для количественного определения специфической конструкции Bt176

	Образец 1 0,100 % ± ± 0,002 %	Образец 2 0,50 % ± ± 0,01 %	Образец 3 1,0 % ± ± 0,02 %	Образец 4 2,0 % ± ± 0,04 %	Образец 5 Смесь А (2 %)	Образец 6 2 % ТСЗ
Год межлабораторных испытаний	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Количество участвовавших лабораторий, шт.	17	17	17	17	17	17
Число выбросов [a]	1	0	0	0	2	2
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов, шт.	16	17	17	17	15	15
Среднее значение, %	0,13	0,67	1,47	2,27	2,04	0,75
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,03	0,13	0,28	0,45	0,37	0,21
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	22,28	19,48	18,83	19,88	18,22	27,71
Предел повторяемости r ($r = 2{,}8\ s_r$)	0,08	0,37	0,78	1,26	1,04	0,58
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R	0,05	0,26	0,55	0,92	0,85	0,25
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	36,13	39,23	37,19	40,72	41,62	32,90
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$)	0,13	0,74	1,54	2,59	2,38	0,69
[a] Выбросы были идентифицированы с помощью тестов Граббса и Кохрана [24].						

С.3.2.3 Молекулярная специфичность

С.3.2.3.1 Общие положения

Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, указана в [31].

С.3.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ [29)] с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.4 [29)] [8 декабря 2002 г.]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

С.3.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Были идентифицированы СЭМ из IRMM-411 [29)] из высушенной кукурузной муки, содержащей от 0,1 % до 5 % кукурузы Event176. Были протестированы такие пищевые материалы, как соевая мука и соевые белковые изоляты.

Не наблюдали никаких специфических продуктов амплификации со специфической системой праймер – зонд для кукурузы Event176 и ДНК из 20 различных линий: кукурузы (сорта *Zea mays*) или риса (*Oryza sativa*), ржи (*Secale cereale*), пшеницы (*Triticum aestivum*), ячменя (*Hordeum vulgare*), проса (*Panicum miliaceum*), чечевицы (*Lens culinaris*), белой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), золотистой фасоли (*Phaseolus aureus*), желтого люпина (*Lupinus luteus*), теосинте мексиканского (*Zea mays* ssp. *mexicana*), томата (*Lycopersicon esculentum*), картофеля (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*), сорго (*Sorghum vulgare*), кукурузы (*Zea mays*), рапса (*Brassica napus*), овса (*Avena sativa*), полбы (*Triticum spelta*), льна (*Linum usitatissimum*), гречихи (*Fagopyrum esculentum*), кунжута (*Sesamum* spec.), человека (*Homo sapiens sapiens*), лосося (*Salmo salar*), говядины (*Bos taurus*) и *Bacillus subtilis*. Более того, не

[29)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

обнаружено перекрестной реактивности с ГМ-соей линии GTS 40-3-2 или со следующими ГМ-сортами кукурузы: Bt11, T25, MON 810, CBH351, DBT418 и GA21.

Для специфической системы «праймер – зонд» для кукурузного гена *hmg* продукты амплификации были обнаружены только с ДНК из различных линий не модифицированной генетически кукурузы и с ДНК из СЭМ IRMM-411 [30)], но ни с одним из других вышеперечисленных видов, кроме близкого родственника кукурузы – теосинте мексиканского (*Zea mays* ssp. *mexicana*).

С.3.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для СОП ABI PRISM 7700® [30)] с использованием TaqMan®chemistry [30]. Никакой дополнительной оптимизации не производили для СОП GeneAmp® 5700 [30)], поскольку термоциклер в этом приборе идентичен термоциклеру в ABI PRISM 7700® [30)].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [30)].

С.3.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Предел обнаружения в ходе межлабораторных испытаний не оценивался.

LOD для ПЦР рассчитывался с помощью измерения серии разбавлений целевой ДНК.

В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что LOD составлял пять копий целевой последовательности (определен с плазмидами).

С.3.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Предел количественного определения для стадии ПЦР был определен путем измерения серии разбавлений целевой ДНК.

Предел количественного определения был рассчитан разработчиком метода в размере 50 копий генома кукурузы Event176 в 82 000 копий генома на основе теоретического размера генома 2725 пг на гаплоидный геном [14].

Концентрации, исследованные в межлабораторных испытаниях, приведены в таблице С.11.

Примечание – Число копий в межлабораторных испытаниях не определялось.

С.3.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.3.4 Принцип метода

Фрагмент синтетического гена *cry1A* (*b*) размером 129 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары специфических праймеров. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для синтетического гена *cry1A* (*b*), помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [30)].

Фрагмент последовательности специфического для кукурузы гена *hmg* размером 79 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением *hmg*-специфического олигонуклеотидного зонда, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя.

Примечание – Кукуруза Event176 (Maximizer™) содержит две копии синтетического гена *cry1A* (*b*) под контролем промотора гена кукурузной кальций-зависимой протеинкиназы (КЗПК6) и под контролем промотора гена кукурузной фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕПК) соответственно.

Для количественного определения экстракта ДНК неизвестного исследуемого образца использовался метод эталонной кривой. Отдельные калибровочные кривые для каждой системы «праймер – зонд» генерируются в одном и том же аналитическом амплификационном пробеге. Калибровочные кривые включают четыре разбавления ДНК, экстрагированной из 5%-ного СЭМ IRMM-411, который использовался в качестве эталонного материала для калибровки. В каждой из четырех калибровочных точек проводилось дублирующее определение. Проводились тройные реакции для каждого из двух экстрактов ДНК-матрицы из неизвестного исследуемого образца с использованием соответствующих разбавлений ДНК.

[30)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Перед количественным прогоном проводили прогон ПЦР в реальном времени по крайней мере с двумя разбавлениями ДНК, экстрагированной из испытательных образцов (например, 1 : 10 и 1 : 40 разбавлений раствора ДНК), для контроля способности к амплификации. Данные, полученные в ходе этого «контрольного прогона», использовали для контроля качества ДНК (ингибирования). Значения C_t, полученные из двух линейных разбавлений, должны быть пропорциональны определенному различию значений C_t (ΔC_t), например разбавление один к четырем приводит к значению ΔC_t, равному приблизительно 2. Меньшее значение ΔC_t указывает на нелинейную амплификацию, которая может быть вызвана ингибиторами ПЦР. Значение C_t неизвестной ДНК, определенное в ходе «контрольного прогона», дает также информацию о количестве целевой ДНК. Таким образом, выбирается подходящая концентрация ДНК неизвестного исследуемого образца, которая должна находиться в динамическом диапазоне эталонной кривой.

С.3.5 Реактивы

С.3.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.3.5.2 Вода

С.3.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$) 10-кратный

С.3.5.4 Раствор $MgCl_2$, *с* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

С.3.5.5 Раствор дНТФ, *с* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л

С.3.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице С.12.

Таблица С.12 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность эталонного гена		
ZM1-F	5'-TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA-3'	300 нмоль/л
ZM1-R	5'-gCT ACA TAg ggA gCC TTg TCC T-3'	300 нмоль/л
ZM1-зонд	5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-TAMRA-3' [a]	160 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
CRY2-F	5'- CCC ATC gAC ATC AgC CTg AgC-3'	300 нмоль/л
CRY2-R	5'-CAg gAA ggC gTC CCA CTg gC-3'	300 нмоль/л
BTSYN-зонд	5'-FAM-ATg TCC ACC Agg CCC AgC ACg-TAMRA-3' [a]	160 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер таксон-специфического ПЦР-продукта составляет 79 п. о.; размер специфического к кукурузе Event176 ПЦР-продукта составляет 129 п. о.

С.3.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [31)].

С.2.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

С.3.6 Аппаратура

С.3.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.3.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован с прибором СОП ABI PRISM® 7700 и СОП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems) [31)]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

[31)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.3.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [31)].

С.3.7 Порядок проведения ПЦР

С.3.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности эталонного гена и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.13 и С.14.

Таблица С.13 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (от 2,3 до 150 нг ДНК-кукурузы)		5 мкл
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза (при необходимости)	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер A TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	4,5 ммоль/л
Праймеры	ZM1-F и ZM1-R (см. таблицу С.12)	См. С.3.5.6
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	Зонд ZM1 (см. таблицу С.12)	См. С.3.5.6
[a] ROX – карбокси-Х-родамин.		

Таблица С.14 – Окончательный объем/концентрация реакционной смеси для амплификации целевой последовательности ГМО (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (от 2,3 до 150 нг ДНК-кукурузы)		5 мкл
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза (при необходимости)	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер A TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	4,5 ммоль/л
Праймеры	CRY2-F и CRY2-R (см. С.3.5.6)	См. С.3.5.6
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонд	Зонд BTSYN (см. С.3.5.6)	См. С.3.5.6
[a] ROX – карбокси-Х-родамин.		

С.3.7.2 Контроль ПЦР

В качестве положительного контроля могут быть использованы СЭМ кукурузы Event176, производимые IRMM, Гиль, Бельгия (серии IRMM-411) [32)] [5].

Должны быть проведены все виды контроля, установленные в ISO 24276.

[32)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.3.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.15, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [32]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с ДНК-полимеразой AmpliTaq Gold® [32]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой полимеразы.

Условия реакции указаны в таблице С.15.

Таблица С.15 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация (при необходимости, когда добавлен UNG)		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

С.3.8 Ограничения и оценка результатов

Приведенный метод пригоден для измерения соотношения ДНК, специфической для кукурузы Event176, и ДНК обычной кукурузы. Это соотношение отражает количество кукурузы Event176 в кукурузном ингредиенте исследуемого пищевого продукта.

Примечание – Если ДНК-кукуруза была утрачена или сильно деградирована в ходе обработки пищевого продукта при его приготовлении (например, при получении рафинированного масла) или если кукуруза является только очень минорным компонентом анализируемого образца, количество кукурузного стандарта и/или ГМ-специфических копий будет на уровне или ниже предела количественного определения, описанные методы не будут применимыми.

С.3.9 Калибровка и расчет результатов

Отдельные калибровочные кривые для каждой системы «праймер – зонд» генерируются в ходе одного и того же аналитического амплификационного пробега. Калибровочные кривые включают четыре разбавления ДНК, экстрагированной из 5%-ного СЭМ IRMM-411 [33]. В каждой из четырех калибровочных точек проводилось двойное обнаружение (СОП ABI PRISM® 7700 и СОП GeneAmp® 5700) [33]. Использовали серию разбавлений с интервалом один к четырем при стартовой концентрации 40 000 копий генома (по оценкам одна копия кукурузного генома соотносится с 2 725 пг гаплоидной геномной ДНК-кукурузы [4]). Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, измеряли с помощью инструментов ABI.

Калибровочная кривая получается путем построения графика значений C_t относительно логарифма числа копий целевой последовательности для калибровочных точек. Это может быть осуществлено, например, путем использования программного обеспечения (электронной таблицы), такой как Microsoft Excel [33], или напрямую с помощью опций, доступных в программном обеспечении СОП.

Число копий, измеренное для ДНК неизвестного образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества ДНК-кукурузы Event176 в неизвестном образце число копий целевой последовательности Event176 делится на число копий гена *hmg* и умножается на 100, после чего выражается в процентах.

[33] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.4 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-сои линии GTS 40-3-2 с использованием ПЦР в реальном времени

С.4.1 Введение

В настоящем приложении описан метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена сои (ген лектина, *le*1), и специфического участка ДНК-конструкции – места соединения последовательности хлоропластного транзитного пептида *Petunia hybrida*, и гена 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазы *Agrobacterium* (*epsps*), присутствующего в ГМ-сое линии GTS 40-3-2 (соя Roundup Ready®, RRS). Метод основан на ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды pMulSL2 в качестве эталонного материала для количественного определения относительного количества GTS 40-3-2 в сое с использованием конверсионного фактора (далее – Cf), представляющего собой отношение числа копий GTS 40-3-2-специфических и таксон-специфических последовательностей ДНК в образце семян истинной сои линии GTS 40-3-2.

Примечание – Cf используется для расчета содержания ГМО в процентах (по массе) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. Cf может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего эталонного материала.

Ограничения см. в С.4.8.

С.4.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.4.2.1 Общие положения

Метод оптимизирован для приборов СОП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени [33)] с использованием плазмиды pMulSL2 в качестве эталонного материала [33]. Плазмида pMulSL2 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из соевых бобов (*Le*1) и последовательности специфической конструкции сои линии GTS 40-3-2.

Примечание – Плазмида использовалась в качестве калибровочного вещества для определения содержания ГМО, рассчитанного из относительного числа копий ГМ-специфической и таксон-специфической последовательностей ДНК.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием эталонных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян сои, содержащих смеси сои линии GTS 40-3-2 и обычной сои [34].

Число копий таксон-специфической последовательности (*Le*1) в расчете на геном оценивалось для 10 представительных разновидностей сои.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [35], [36], [37], [38].

С.4.2.2 Межлабораторные испытания

Шесть пар неизвестных образцов сои, содержащих от 0 % до 10 % высушенной соевой муки, полученной из сои линии GTS 40-3-2, были проанализированы пятнадцатью участниками.

Примечание 1 – Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей соевой муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой соевой муки, полученной из сои линии GTS 40-3-2. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [39].

Валидация метода для GTS 40-3-2 была проведена путем межлабораторных испытаний в соответствии с протоколом AOAC [34], [39]. Межлабораторные испытания были организованы Национальным институтом исследования пищевых продуктов (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям (Saitama, Япония) и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences, Япония). Пятнадцать участников из Японии, Корейской Республики и Соединенных Штатов проводили это совместное испытание с использованием СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [34)] в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР. Цель первой стадии – определение Cf для GTS 40-3-2. Все участники получили набор праймеров, зондов, эталонный материал и

[34)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

ДНК, экстрагированную из семян сои линии GTS 40-3-2, которые были приготовлены Qiagen DNA Easy Plant Maxikit [34)]. Эта ДНК использовалась для измерения числа копий в каждой специфической конструкции и таксон-специфической для сои последовательности ДНК. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 135 данных. Корреляции калибровочных кривых, к которым были приложены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0,990$). В соответствии с протоколом AOAC [39] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0,025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0,025$). Ни одного выброса не наблюдалось, как это показано в таблице С.16.

Таблица С.16 – Итоговые результаты Cf

Целевая последовательность	Последовательность специфической конструкции GTS 40-3-2
Количество участвовавших лабораторий, шт.	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Количество оставшихся лабораторий, шт.	15
Cf [a]	0,95 ± 0,02
[a] Выражено как средняя ± доверительный интервал ($\alpha = 0,05$).	

Значение Cf может быть повторно определено исследователями с использованием подходящих эталонных материалов сои линии GTS 40-3-2.

На второй стадии были проведены «слепые» испытания. Неизвестные образцы соевой муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-сои линии GTS 40-3-2 в смеси с обычной соевой мукой. Образец, содержащий 0 % сои линии GTS 40-3-2, был использован как «холостой» образец, чтобы исключить некомпетентные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen. Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала ($\alpha = 0,05$). Средние значения были определены как Cf для расчета количества ГМО в процентах в ходе «слепого» испытания. Среднее значение Cf для количественного определения последовательности специфической конструкции GTS 40-3-2 равно 0,95.

Тринадцать лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 156 образцов путем амплификации *Le*1 и последовательности специфической конструкции. Лаборатории, которые не смогли определить, что «холостые» образцы содержат 0 % сои линии GTS 40-3-2, были расценены как некомпетентные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми ($r > 0,990$). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных (выбросы по тесту Кохрана [40] и выбросы по тесту Граббса [41] соответственно) в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями GTS 40-3-2, были исключены из испытания еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных не обнаружено выбросов ни по тесту Кохрана, ни по тесту Граббса. Рассчитанное среднее значение, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости в процентах и относительное стандартное отклонение воспроизводимости в процентах для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.17.

Примечание 2 – Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения Cf, определенного в ходе первой стадии совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения Cf и проведении «слепых» испытаний, было передано в NFRI, и величины содержания ГМО в процентах в «слепых» исследуемых образцах были преобразованы в окончательные результаты с использованием значения Cf.

Таблица С.17 – Данные валидации для количественного определения последовательности специфической конструкции GTS 40-3-2

	Доля ГМ-сои линии GTS 40-3-2 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Количество участвовавших лабораторий, шт.	13	13	13	13	13
Количество исключенных лабораторий, шт.	1	1	1	1	1
Число выбросов по тесту Кохрана	0	0	0	0	0
Число выбросов по тесту Граббса	1	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	11	12	12	12	12
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,6	1,2	5,8	11,7
Отклонение от истинного значения, %	+8,1	+14,3	+16,1	+15,1	+17,2
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,015	0,068	0,129	0,435	0,993
Предел повторяемости r [a] ($r = 2{,}8\ s_r$)	0,041	0,191	0,362	1,219	2,779
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	13,4	12,0	11,2	7,6	8,5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,015	0,091	0,161	0,660	1,246
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2{,}8\ s_R$)	0,041	0,255	0,451	1,849	3,489
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	13,4	15,9	13,9	11,5	10,6
Ниже 20 копий [c] (абсолютный предел обнаружения этого метода)	4/22	0/24	0/24	0/24	0/24

[a] Выражается в процентах ГМО.
[b] Выражается как процент от среднего значения.
[c] Ниже 20 копий выражается как отношение числа оставшихся данных ниже 20 копий к суммарному числу оставшихся данных.

С.4.2.3 Молекулярная специфичность

С.4.2.3.1 Общие положения

Метод описан в [33]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном сои, указана в [33] и [22]. Последовательности ДНК для разработки этого метода могут быть получены, например, в DDBJ [35)], регистрационный номер базы данных X04879, в отчете [42] и в патенте США, номер 5633435.

Если ДНК-конструкция, встроенная в GTS 40-3-2, использована в других ГМ-событиях, может быть получен ложноположительный результат, поскольку амплифицируемая последовательность происходит из этой конструкции.

С.4.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных DDBJ [35)] (3 декабря 1999 г.), и результаты по оценке безопасности были опубликованы Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства Японии с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [36)]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.4.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании образцов высушенной соевой муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-сои линии GTS 40-3-2, которые были приготовлены для этого метода NFRI [33], [34].

[35)] DDBJ: DNA Data Bank of Japan (gost.e-ecolog.ru).

[36)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторной системы со следующими нецелевыми видами/образцами: рисом (*Oryza sativa*), пшеницей (*Triticum aestivum*) и ячменем (*Hordeum vulgare*). Не наблюдали перекрестной реактивности со следующими линиями ГМ-кукурузы: MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

С.4.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов проводилась с помощью СОП ABI PRISM 7700® с использованием TaqMan®chemistry [36] [43].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.4.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOD, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,1 % сои линии GTS 40-3-2.

С.4.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала.

Относительный LOQ, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,1 % сои линии GTS 40-3-2.

С.4.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.4.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции сои линии GTS 40-3-2 размером 121 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары праймеров, специфических для GTS 40-3-2. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции GTS 40-3-2, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [37].

Фрагмент последовательности таксон-специфического гена лектина сои (*Le*1) размером 118 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для гена *Le*1, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для гена *Le*1, производства TaqMan® [37].

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой «праймер – зонд» генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые строились из пяти концентраций, включая 20, 125, 1 500, 20 000, 250 000 копий ДНК-плазмиды pMulSL2. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [37] в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t («порогового цикла»), определенных для калибровочных точек в специфической для *Le*1 или целевой последовательности конструкции GTS 40-3-2 соответственно, от логарифма числа копий ДНК-плазмиды pMulSL2 [33] использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное для ДНК исследуемого образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества (в процентах) GTS 40-3-2 в исследуемом образце число копий конструкции GTS 40-3-2 делится на число копий гена *Le*1 и значение Cf, специфическую конструкцию GTS 40-3-2, умноженную на 100, как описано в С.4.9.

---

[37] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.4.5 Реактивы

С.4.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.4.5.2 Вода

С.4.5.3 TaqMan® Universal Master Mix 37 двукратный

С.4.5.4 Эталонный материал (плазмида)

Эталонным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMulSL2 [33], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ-сои (RRS; Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 310-04981) [37)].

С.4.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфической конструкции и таксон-специфических генов сои линии GTS 40-3-2 приведены в таблице С.18.

Таблица С.18 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
*Le*1n02-5'	5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC A-3'	500 нмоль/л
*Le*1n02-3'	5'-gCC CAT CTg CAA gCC TTT TT-3'	500 нмоль/л
*Le*1-Taq	5'-FAM-AgC TTC gCC gCT TCC TTC AAC TTC AC-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
RRS 01-5'	5'-CCT TTA ggA TTT CAg CAT CAg Tgg-3'	500 нмоль/л
RRS 01-3'	5'-gAC TTg TCg CCg ggA ATg -3'	500 нмоль/л
RRS-Taq	5'-FAM- CgC AAC CgC CCg CAA ATC C-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер лектинового ПЦР-продукта составляет 118 п. о.; размер ПЦР-продукта GTS 40-3-2 составляет 121 п. о.

С.4.6 Аппаратура

С.4.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.4.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован при проведении межлабораторных испытаний с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [38)]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.4.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [38)] соответственно.

С.4.7 Порядок проведения ПЦР

С.4.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *Le*1 и для специфической целевой последовательности линии GTS 40-3-2 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

[38)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.19 для *Le*1 и С.20 для GTS 40-3-2.

Таблица С.19 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности *Le*1 (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-сои)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	*Le*1n02-5' и *Le*1n02-3' (см. таблицу С.18)	См. таблицу С.18
Зонд	*Le*1-Taq (см. таблицу С.18)	См. таблицу С.18

Таблица С.20 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации специфической последовательности GTS 40-3-2 (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-сои)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	RRS 01-5' и RRS 01-3' (см. таблицу С.18)	См. таблицу С.18
Зонд	RRS -Taq (см. таблицу С.18)	См. таблицу С.18

С.4.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступны по крайней мере две альтернативы, а именно:

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из соевых бобов, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома сои;

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность (и) может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Soybean (RRS) Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 and Nippon Gene № 310-04981 [39]) [33].

С целью обеспечения качества контроля предпочтительно не использовать один и тот же материал в качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала.

С.4.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.21, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [39]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с универсальной смесью для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan® [39]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.21 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	59

[39] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.4.8 Ограничения и оценка результатов

Если иная ГМ-соя, чем соя линии GTS 40-3-2, содержит ту же самую специфическую конструкцию последовательности ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК-сои линии GTS 40-3-2 при отсутствии иных ГМО, чем соя линии GTS 40-3-2.

Приведенный метод пригоден только для количественного определения сои линии GTS 40-3-2 при отсутствии других ГМ-событий, содержащихся в этой конструкции. Это соотношение отражает количество сои линии GTS 40-3-2 в исследуемом образце сои. Метод валидирован только для сои.

Межлабораторные испытания являются ценным источником данных для обеспечения оценки погрешности измерений. Также необходимо учитывать другие источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, например отбор проб и другие, в соответствии с международными требованиями [44], [45].

С.4.9 Калибровка и расчет результатов

Специалистом должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t). Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве по эталонным материалам ГМ-сои [GM Soybean (RRS) Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 310-04981)]. См. также [33].

Cf для количественного определения конструкции, специфической для сои линии GTS 40-3-2 и референсной плазмиды, использовавшихся в межлабораторных испытаниях, равен 0,95. Расчет количества RRS в образце сои w, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \times \frac{100}{Cf},$$

где N_{GM} – число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца;

N_{TX} – число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца.

С.5 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии MON 810 с использованием ПЦР в реальном времени

С.5.1 Введение

В настоящем приложении описан метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, *IIb: zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции – места соединения последовательности интрона гена белка теплового шока 70 кукурузы и синтетического гена *cryIA*(*b*), происходящего из *Bacillus thuringiensis*, присутствующего в ГМ-кукурузе линии MON 810, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве эталонного материала для количественного определения количества MON 810 с применением Cf, представляющего собой отношение числа копий специфической конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии MON 810.

Примечание – Cf используется для расчета содержания ГМО в процентах (по массе) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. Cf может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего эталонного материала.

Ограничения см. в С.5.8.

С.5.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.5.2.1 Общие положения

Метод оптимизирован для приборов СОП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени [40)] с использованием плазмиды pMul5 [40)] в качестве эталонного материала [33]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации

[40)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS) и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

Примечание – Плазмида использовалась в качестве калибровочного материала для определения содержания ГМО, рассчитанного из относительного числа копий ГМ-специфической и таксон-специфической последовательностей ДНК.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием эталонных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержавших смеси зерен линии MON 810 и обычной кукурузы [34].

Число копий таксон-специфической последовательности (*zSSIIb*) в расчете на геном оценивалось для 20 представительных разновидностей кукурузы.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [35], [36], [37], [38].

С.5.2.2 Межлабораторные испытания

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержащих от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии MON 810, были проанализированы пятнадцатью участниками.

Примечание 1 – Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для межлабораторных испытаний были использованы семена образца линии MON 810, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [34], [39].

Валидация метода для кукурузы линии MON 810 была проведена путем межлабораторных испытаний в соответствии с протоколом AOAC [39]. Межлабораторные испытания были организованы Национальным институтом исследования пищевых продуктов (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям (Saitama, Япония) и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences, Япония).

Пятнадцать лабораторий, включая участников из Японии, Корейской Республики и Соединенных Штатов, проводили это совместное испытание с использованием СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [41)] в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Цель первой стадии – определение Cf для MON 810. Все участники получили набор праймеров, зондов, эталонный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии MON 810, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit [41)] и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции, специфической для MON 810 и таксон-специфической последовательности (*zSSIIb*) ДНК-кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0{,}990$). В соответствии с протоколом AOAC [39] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0{,}025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0{,}025$). После обоих тестов одна лаборатория была выявлена как выброс по тесту Кохрана по соотношению конструкции, специфической для MON 810 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb*. Ни одного выброса не наблюдалось по другим соотношениям, как это показано в таблице С.22.

[41)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.22 – Итоговые результаты Cf для MON 810

Целевая последовательность	Последовательность специфической конструкции MON 810
Количество участвовавших лабораторий, шт.	15
Число выбросов по тесту Кохрана	1
Число выбросов по тесту Граббса	0
Количество оставшихся лабораторий, шт.	14
Cf [a]	0,38 ± 0,01
[a] Выражено как средняя ± доверительный интервал (α = 0,05).	

Значение Cf может быть повторно определено исследователями с использованием подходящих эталонных материалов кукурузы линии MON 810.

На второй стадии были проведены «слепые» испытания. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии MON 810 в смеси с обычной кукурузной мукой. Образец, содержащий 0 % кукурузы линии MON 810, был использован как «холостой» образец, чтобы исключить некомпетентные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen [41)].

Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала (α = 0,05).

Средние значения были определены как Cf для расчета количества ГМО в процентах в ходе «слепого» испытания. Среднее значение Cf для количественного определения последовательности специфической конструкции MON 810 равно 0,38.

Четырнадцать лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности специфической конструкции MON 810. Лаборатории, которые не смогли определить, что «холостые» образцы содержат 0 % кукурузы линии MON 810, были расценены как некомпетентные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми (r > 0,990). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных (выбросы по тесту Кохрана [40] и выбросы по тесту Граббса [41] соответственно) в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями MON 810, были исключены из испытания еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных обнаружено пять выбросов по тесту Кохрана и один по тесту Граббса. Рассчитанное среднее значение, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости в процентах и относительное стандартное отклонение воспроизводимости в процентах для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.23 [34].

Примечание 2 – Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения Cf, определенного в ходе первой стадии совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения Cf и проведении «слепых» испытаний, было передано в NFRI, и величины содержания ГМО в процентах в «слепых» исследуемых образцах были преобразованы в окончательные результаты с использованием значений Cf.

Таблица С.23 – Данные валидации для количественного определения последовательности специфической конструкции кукурузы MON 810

	Доля ГМ-кукурузы линии MON 810 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Количество участвовавших лабораторий, шт.	14	14	14	14	14
Количество исключенных лабораторий, шт.	0	0	0	0	0
Число выбросов по тесту Кохрана	2	1	0	1	1
Число выбросов по тесту Граббса	1	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	11	13	14	13	13
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,5	1,0	4,8	9,8
Отклонение от истинного значения, %	+25,0	+9,4	+4,6	−4,3	−1,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,040	0,082	0,124	0,647	1,028
Предел повторяемости r [a] (r = 2,8 s_r)	0,113	0,231	0,347	1,813	2,879

Окончание таблицы С.23

	Доля ГМ-кукурузы линии MON 810 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	13,4	12,0	11,2	7,6	8,5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,040	0,107	0,158	0,647	1,140
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2{,}8 \times s_R$)	0,113	0,301	0,443	1,813	3,191
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	32,3	19,6	15,1	13,5	11,6
Ниже 20 копий [c] (абсолютный предел обнаружения этого метода)	19/22	0/26	0/28	0/26	0/26

[a] Выражается в процентах ГМО.
[b] Выражается как процент от среднего значения.
[c] Ниже 20 копий выражается как отношение числа оставшихся данных ниже 20 копий к суммарному числу оставшихся данных.

С.5.2.3 Молекулярная специфичность

С.5.2.3.1 Общие положения

Метод описан в [33]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, указана в [33] и [46]. Праймеры и зонды TaqMan® [42)] для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, указанной в [46].

Если ДНК-конструкция, встроенная в MON 810, используется в других ГМ-событиях, может быть получен ложноположительный результат, поскольку амплифицируемая последовательность происходит из этой конструкции.

С.5.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных DDBJ [43)] (3 декабря 1999 г.), и результаты по оценке безопасности были опубликованы Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства Японии с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [44)]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.5.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании образцов высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии MON 810, которые были приготовлены для этого метода NFRI [33], [34].

Для испытаний были использованы образцы зерен кукурузы, кукурузной крупы, кукурузной муки грубого и тонкого помола.

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторной системы со следующими нецелевыми видами/образцами: рисом (*Oryza sativa*), пшеницей (*Triticum aestivum*) и ячменем (*Hordeum vulgare*). Не наблюдали перекрестной реактивности с ГМ-соей линии GTS 40-3-2 и со следующими линиями ГМ-кукурузы: Event176, Bt11, GA21 и T25.

С.5.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов проводилась с помощью СОП ABI PRISM 7700® [44)] с использованием TaqMan®chemistry [44)] [43].

[42)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[43)] DDBJ: DNA Data Bank of Japan (gost.e-ecolog.ru).

[44)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [44].

С.5.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOD, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,5 % кукурузы линии MON 810.

С.5.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOQ, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,5 % кукурузы линии MON 810.

С.5.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.5.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции кукурузы линии MON 810 размером 113 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары праймеров, специфических для MON 810. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции MON 810, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [44].

Фрагмент последовательности таксон-специфической последовательности *zSSIIb* размером 151 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для *zSSIIb*, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для *zSSIIb*, производства TaqMan® [44].

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой «праймер – зонд» генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые строились из пяти концентраций, включая 20, 125, 1 500, 20 000, 250 000 копий ДНК-плазмиды pMul5 [45] [33].

В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [45] в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t («порогового цикла»), определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции MON 810 соответственно, от логарифма числа копий ДНК-плазмиды pMul5 [33] использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное для ДНК исследуемого образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества MON 810 в исследуемом образце число копий конструкции MON 810 делится на число копий конструкции *zSSIIb* и значение Cf, специфическую конструкцию MON 810, умноженную на 100, как описано в С.5.9.

С.5.5 Реактивы

С.5.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

[45] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.5.5.2 Вода

С.5.5.3 TaqMan® Universal Master Mix [45] двукратный

С.5.5.4 Эталонный материал (плазмида)

Эталонным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5 [45] [33], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ-кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981) [45]. Могут быть использованы и другие эталонные материалы, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.5.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфической конструкции линии MON 810 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.24.

Таблица С.24 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5'	5'-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3'	500 нмоль/л
SSIIb 1-3'	5'-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3'	500 нмоль/л
SSIIb -Taq	5'-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
MON 810 2-5'	5'- gAT gCC TTC TCC CTA gTg TTg A-3'	500 нмоль/л
MON 810 2-3'	5'- ggA TgC ACT CgT TgA TgT TTg-3'	500 нмоль/л
MON 810-Taq	5'-FAM- AgA TAC CAA gCg gCC ATg gAC AAC AA-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ПЦР-продукта *SSIIb* составляет 151 п. о.; размер ПЦР-продукта MON 810 составляет 113 п. о.

С.5.6 Аппаратура

С.5.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.5.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован при проведении межлабораторных испытаний с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [46]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.5.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [46] соответственно. Могут быть использованы и другие реакционные пробирки, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.5.7 Порядок проведения ПЦР

С.5.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *zSSIIb* и для специфической целевой последовательности линии MON 810 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.25 для *zSSIIb* и С.26 для MON 810.

[46] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.25 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb* (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	*SSIIb1*-5' и *zSSIIb1*-3' (см. таблицу С.24)	См. таблицу С.24
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.24)	См. таблицу С.24

Таблица С.26 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации специфической последовательности MON 810 (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	MON 810 2-5' and MON 810 2-3' (см. таблицу С.24)	См. таблицу С.24
Зонд	MON 810-Taq (см. таблицу С.24)	См. таблицу С.24

С.5.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступны по крайней мере две альтернативы, а именно:

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы линии MON 810;

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность (и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 310-04981) [47] [33].

С целью обеспечения качества контроля предпочтительно не использовать один и тот же материал в качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала.

С.5.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.27, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [47]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix [47]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.27 – Условия реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	59

[47] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.5.8 Ограничения и оценка результатов

Если иная ГМ-кукуруза, чем кукуруза линии MON 810, содержит ту же самую специфическую конструкцию последовательности ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК-кукурузы линии MON 810 при отсутствии ГМО, отличных от кукурузы линии MON 810.

Приведенный метод пригоден только для определения соотношения последовательности специфической конструкции линии MON 810 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* кукурузы. Это соотношение отражает количество MON 810 в исследуемом образце кукурузы. Метод валидирован только для зерен кукурузы.

Межлабораторные испытания являются ценным источником данных для обеспечения оценки погрешности измерений. Также необходимо учитывать другие источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, например отбор проб и другие, в соответствии с международными требованиями [44], [45].

С.5.9 Калибровка и расчет результатов

Специалистом должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t). Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве по эталонным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 319-04981) [48]. См. также [33].

Cf для количественного определения конструкции, специфической для линии MON 810 и референсной плазмиды, использовавшихся в межлабораторных испытаниях, равен 0,38. Расчет количества ГМ-кукурузы в матриксе образца *w*, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \times \frac{100}{Cf},$$

где N_{GM} – число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца;

N_{TX} – число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца.

С.6 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии Event176 с использованием ПЦР в реальном времени

С.6.1 Введение

В настоящем приложении описан метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, IIb: *zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции – места соединения синтетического гена *crylA(b)*, происходящего из *Bacillus thuringiensis*, и интрона последовательности № 9 гена фосфоенолпируваткарбоксилазы кукурузы, присутствующего в ГМ-кукурузе линии Event176, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве эталонного материала для определения относительного количества Event176 с применением Cf, представляющего собой отношение числа копий специфической конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии Event176.

Примечание – Cf используется для расчета содержания ГМО в процентах (по массе) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. Cf может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего эталонного материала.

Ограничения см. в С.6.8.

---

[48] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.6.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.6.2.1 Общие положения

Метод оптимизирован для приборов СОП ABI PRISM® 7700 [48] ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды pMulS5 в качестве эталонного материала [33]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон- специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS) и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

Примечание – Плазмида использовалась в качестве калибровочного материала для определения содержания ГМО, рассчитанного из относительного числа копий ГМ-специфической и таксон-специфической последовательностей ДНК.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием эталонных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержащих смеси зерен линии Event176 и обычной кукурузы [34].

Число копий таксон-специфической последовательности (*zSSIIb*) в расчете на геном оценивалось для 20 представительных разновидностей кукурузы.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [35], [36], [37], [38].

С.6.2.2 Межлабораторные испытания

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержащих от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии Event176, были проанализированы пятнадцатью участниками.

Примечание 1 – Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для межлабораторных испытаний были использованы семена образца линии Bt176, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [34], [39].

Валидация метода для кукурузы линии Event176 была проведена путем межлабораторных испытаний в соответствии с протоколом AOAC [39]. Межлабораторные испытания были организованы Национальным институтом исследования пищевых продуктов (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям (Saitama, Япония) и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences, Япония).

Пятнадцать лабораторий, включая участников из Японии, Корейской Республики и Соединенных Штатов, проводили это совместное испытание с использованием СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [49] в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Цель первой стадии – определение Cf для Event176. Все участники получили набор праймеров, зондов, эталонный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии Event176, которые были приготовлены Qiagen DNeasy Plant Maxi kit [49] и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции, специфической для Event176 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* ДНК. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0{,}990$). В соответствии с протоколом AOAC [39] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0{,}025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0{,}025$). Ни одного выброса не наблюдалось ни в одном из тестов, как это показано в таблице С.28.

[49] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.28 – Итоговые результаты Cf для Event176

Целевая последовательность	Последовательность специфической конструкции Event176
Количество участвовавших лабораторий, шт.	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Количество оставшихся лабораторий, шт.	15
Cf [a]	2,05 ± 0,04
[a] Выражено как средняя ± доверительный интервал (α = 0,05).	

Значение Cf может быть повторно определено исследователями с использованием подходящих эталонных материалов кукурузы линии Event176.

На второй стадии были проведены «слепые» испытания. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси с обычной кукурузной мукой. Образец, содержащий 0 % кукурузы линии Event176, был использован как «холостой» образец, чтобы исключить некомпетентные лаборатории перед статистическим анализом.

Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen.

Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала (α = 0,05). Средние значения были определены как Cf для расчета количества ГМО в процентах в ходе «слепого» испытания. Среднее значение Cf для количественного определения последовательности специфической конструкции Event176 равно 2,05.

Четырнадцать лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности специфической конструкции Event176. Лаборатории, которые не смогли определить, что «холостые» образцы содержат 0 % кукурузы линии Event176, были расценены как некомпетентные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми (r > 0,990). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных (выбросы по тесту Кохрана [40] и выбросы по тесту Граббса [41] соответственно) в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями Event176, были исключены из испытания еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных обнаружено четыре выброса по тесту Кохрана. Рассчитанное среднее значение, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости в процентах и относительное стандартное отклонение воспроизводимости в процентах для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.29.

Примечание 2 – Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения Cf, определенного в ходе первой стадии совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения Cf и проведении «слепых» испытаний, было передано в NFRI, и величины содержания ГМО в процентах в «слепых» исследуемых образцах были преобразованы в окончательные результаты с использованием значений Cf.

Таблица С.29 – Данные валидации для количественного определения последовательности специфической конструкции кукурузы Event176

	Доля ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Количество участвовавших лабораторий, шт.	14	14	14	14	14
Количество исключенных лабораторий, шт.	1	1	1	1	1
Число выбросов по тесту Кохрана	1	2	0	0	1
Число выбросов по тесту Граббса	0	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	12	11	13	13	12
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,5	0,9	5,0	9,6
Отклонение от истинного значения, %	+11,3	−1,6	−7,7	0,0	−3,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,018	0,029	0,066	0,406	0,554

Окончание таблицы С.29

	Доля ГМ-кукурузы линии Event176 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Предел повторяемости r [a] ($r = 2{,}8 \times s_r$)	0,051	0,080	0,184	1,137	1,552
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	16,3	5,8	7,1	8,1	5,8
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,024	0,051	0,106	0,559	0,917
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2{,}8$)	0,066	0,142	0,296	1,565	2,566
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	21,3	10,3	11,4	11,2	9,5
Ниже 20 копий [c] (абсолютный предел обнаружения этого метода)	1/24	0/22	0/26	0/26	0/24

[a] Выражается в процентах ГМО.
[b] Выражается как процент от среднего значения.
[c] Ниже 20 копий выражается как отношение числа оставшихся данных ниже 20 копий к суммарному числу оставшихся данных.

С.6.2.3 Молекулярная специфичность

С.6.2.3.1 Общие положения

Метод описан в [33]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, указана в [33] и [46]. Праймеры и зонды TaqMan® [50] для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, указанной в [46].

Если ДНК-конструкция, встроенная в Event176, используется в других ГМ-событиях, может быть получен ложноположительный результат, поскольку амплифицируемая последовательность происходит из этой конструкции.

С.6.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных DDBJ [51] (3 декабря 1999 г.), и результаты по оценке безопасности были опубликованы Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства Японии с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [50]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.6.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании образцов высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии Event176, которые были приготовлены для этого метода NFRI [33], [34].

Для испытаний были использованы образцы зерен кукурузы, кукурузной крупы, кукурузной муки грубого и тонкого помола.

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторной системы со следующими нецелевыми видами/образцами: рисом (*Oryza sativa*), пшеницей (*Triticum aestivum*) и ячменем (*Hordeum vulgare*). Не наблюдали перекрестной реактивности с ГМ-соей линии GTS 40-3-2 и со следующими линиями ГМ-кукурузы: MON 810, Bt11, GA21 и T25.

С.6.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов проводилась с помощью СОП ABI PRISM 7700® (ABI) с использованием TaqMan®chemistry [50] [43].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

---

[50] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[51] DDBJ: DNA Data Bank of Japan (gost.e-ecolog.ru).

С.6.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOD, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,1 % кукурузы линии Event176.

С.6.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOQ, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,1 % кукурузы линии Event176.

С.6.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.6.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции кукурузы линии Event176 размером 100 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары праймеров, специфических для Event176. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции Event176, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [52)].

Фрагмент последовательности таксон-специфической последовательности *zSSIIb* размером 151 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для *zSSIIb*, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для *zSSIIb*, производства TaqMan® [52)].

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой «праймер – зонд» генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые строились из пяти концентраций, включая 20, 125, 1 500, 20 000, 250 000 копий ДНК-плазмиды pMul5 [52)]. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t, определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции Event176 соответственно, от логарифма числа копий ДНК-плазмиды pMul5 [33] использовали для построения калибровочной кривой.

Число копий, определенное для ДНК исследуемого образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества Event176 в исследуемом образце число копий конструкции Event176 делится на число копий гена *zSSIIb* и значение Cf, специфическую конструкцию Event176, умноженную на 100 для получения процентов, как описано в С.6.9.

С.6.5 Реактивы

С.6.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.6.5.2 Вода

С.6.5.3 TaqMan® Universal Master Mix [52)] двукратный

С.6.5.4 Эталонный материал (плазмида)

Эталонным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5 [33], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ-кукурузы (Fasmac № PM-2 и

[52)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Nippon Gene № 319-04981) [52]. Могут быть использованы и другие эталонные материалы, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.6.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфической конструкции линии Event176 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.30.

Таблица С.30 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5'	5'-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3'	500 нмоль/л
SSIIb 1-3'	5'-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3'	500 нмоль/л
SSIIb -Taq	5'-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
E176 2-5'	5'-TgT TCA CCA gCA gCA ACC Ag-3'	500 нмоль/л
E176 2-3'	5'-ACT CCA CTT TgT gCA gAA CAg ATC T-3'	500 нмоль/л
E176-Taq	5'-FAM-CCg ACg TgA CCg ACT ACC ACA TCg A-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
a FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ПЦР-продукта SSIIb составляет 151 п. о.; размер ПЦР-продукта Event176 составляет 100 п. о.

С.6.6 Аппаратура

С.6.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.6.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован при проведении межлабораторных испытаний с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [53]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.6.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [53] соответственно. Могут быть использованы и другие реакционные пробирки, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.6.7 Порядок проведения ПЦР

С.6.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *zSSIIb* и для специфической целевой последовательности линии Event176 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.31 для *zSSIIb* и С.32 для Event176.

[53] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.31 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb* (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*-5' и *zSSIIb* -3' (см. таблицу С.30)	См. таблицу С.30
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.30)	См. таблицу С.30

Таблица С.32 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации специфической последовательности Event176 (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	E176 2-5' and E176 2-3' (см. таблицу С.30)	См. таблицу С.30
Зонд	E176-Taq (см. таблицу С.30)	См. таблицу С.30

С.6.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступны по крайней мере две альтернативы, а именно:

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы линии Event176;

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность (и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 310-04981 [54)]) [33].

С целью обеспечения качества контроля предпочтительно не использовать один и тот же материал в качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала.

С.6.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.33, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [54)]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix [54)]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.33 – Условия реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	59

[54)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.6.8 Ограничения и оценка результатов

Если иная ГМ-кукуруза, чем кукуруза линии Event176, содержит ту же самую специфическую конструкцию последовательности ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК-кукурузы линии Event176 при отсутствии иных ГМО, чем кукуруза линии Event176.

Приведенный метод пригоден только для определения соотношения последовательности специфической конструкции линии Event176 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* кукурузы. Это соотношение отражает количество Event176 в исследуемом образце кукурузы. Метод валидирован только для зерен кукурузы.

Межлабораторные испытания являются ценным источником данных для обеспечения оценки погрешности измерений. Также необходимо учитывать другие источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, например отбор проб и другие, в соответствии с международными требованиями [44], [45].

С.6.9 Калибровка и расчет результатов

Специалистом должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t). Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве по эталонным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 319-04981). См. также [33].

Cf для количественного определения конструкции, специфической для линии Event176 и референсной плазмиды, использовавшихся в межлабораторных испытаниях, равен 2,05. Расчет количества ГМ-кукурузы в матриксе образца *w*, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \times \frac{100}{Cf},$$

где N_{GM} – число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца;

N_{TX} – число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца.

С.7 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии Bt11 с использованием ПЦР в реальном времени

С.7.1 Введение

В настоящем приложении описан метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, IIb: *zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции – места соединения синтетического гена *cryIA(b)*, происходящего из *Bacillus thuringiensis*, и последовательности интрона гена алкогольдегидрогеназы *Adh*1, присутствующего в ГМ-кукурузе линии Bt11, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве эталонного материала для определения относительного количества Bt11 с применением Cf, представляющего собой отношение числа копий специфической конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии Bt11.

Примечание – Cf используется для расчета содержания ГМО в процентах (по массе) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. Cf может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего эталонного материала.

Ограничения см. в С.7.8.

С.7.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.7.2.1 Общие положения

Метод оптимизирован для приборов СОП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени [55] с использованием плазмиды pMul5 в качестве эталонного материала [33]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора

[55] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS) и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

Примечание – Плазмида использовалась в качестве калибровочного материала для определения содержания ГМО, рассчитанного из относительного числа копий ГМ-специфической и таксон-специфической последовательностей ДНК.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием эталонных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержащих смеси зерен линии Bt11 и обычной кукурузы [34].

Число копий таксон-специфической последовательности (*zSSIIb*) в расчете на геном оценивалось для 20 представительных разновидностей кукурузы.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [35], [36], [37], [38].

С.7.2.2 Межлабораторные испытания

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержащих от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии Bt11, были проанализированы пятнадцатью участниками.

Примечание 1 – Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для межлабораторных испытаний были использованы семена образца линии Bt11, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [34], [39].

Валидация метода для кукурузы линии Bt11 была проведена путем межлабораторных испытаний в соответствии с протоколом AOAC [39]. Межлабораторные испытания были организованы Национальным институтом исследования пищевых продуктов (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям (Saitama, Япония) и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences, Япония). Пятнадцать лабораторий, включая участников из Японии, Корейской Республики и Соединенных Штатов, проводили это совместное испытание с использованием СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Цель первой стадии – определение Cf для Bt11. Все участники получили набор праймеров, зондов, эталонный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии Bt11, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit [56)] и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции, специфической для Bt11 и таксон-специфической *zSSIIb* последовательности ДНК-кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 135 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0{,}990$). В соответствии с протоколом AOAC [39] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0{,}025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0{,}025$). Ни одного выброса не наблюдалось ни в одном из тестов, как это показано в таблице С.34.

Таблица С.34 – Итоговые результаты Cf для Bt11

Целевая последовательность	Последовательность специфической конструкции Bt11
Количество участвовавших лабораторий, шт.	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Количество оставшихся лабораторий, шт.	15
Cf [a]	0,50 ± 0,01
[a] Выражено как средняя ± доверительный интервал (α = 0,05).	

Значение Cf может быть повторно определено исследователями с использованием подходящих эталонных материалов кукурузы линии Bt11.

[56)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

На второй стадии были проведены «слепые» испытания. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии Bt11 в смеси с обычной кукурузной мукой. Образец, содержащий 0 % кукурузы линии Bt11, был использован как «холостой» образец, чтобы исключить некомпетентные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen. Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала (α = 0,05). Средние значения были определены как Cf для расчета количества ГМО в процентах в ходе «слепого» испытания. Среднее значение Cf для количественного определения последовательности специфической конструкции Bt11 равно 0,5.

Четырнадцать лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности специфической конструкции Bt11. Лаборатории, которые не смогли определить, что «холостые» образцы содержат 0 % кукурузы линии Bt11, были расценены как некомпетентные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми (r > 0,990). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных (выбросы по тесту Кохрана [40] и выбросы по тесту Граббса [41] соответственно) в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями Bt11, были исключены из испытания еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных обнаружено два выброса по тесту Кохрана и один по тесту Граббса. Рассчитанное среднее значение, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости в процентах и относительное стандартное отклонение воспроизводимости в процентах для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.35.

Примечание 2 – Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения Cf, определенного в ходе первой стадии совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения Cf и проведении «слепых» испытаний, было передано в NFRI, и величины содержания ГМО в процентах в «слепых» исследуемых образцах были преобразованы в окончательные результаты с использованием значений Cf.

Таблица С.35 – Данные валидации для количественного определения последовательности специфической конструкции кукурузы Bt11

	Доля ГМ-кукурузы линии Bt11 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Количество участвовавших лабораторий, шт.	14	14	14	14	14
Количество исключенных лабораторий, шт.	1	1	1	1	1
Число выбросов по тесту Кохрана	2	0	0	0	0
Число выбросов по тесту Граббса	1	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	11	14	14	14	14
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,5	1,2	6,1	12,1
Отклонение от истинного значения, %	−9,0	+2,0	+14,7	+21,6	+21,1
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,020	0,121	0,216	0,830	1,258
Предел повторяемости r [a] ($r = 2{,}8\ s_r$)	0,057	0,338	0,606	2,325	3,524
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	22,3	23,7	18,9	13,7	10,4
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,020	0,121	0,216	0,830	1,389
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2{,}8 \times s_R$)	0,057	0,338	0,606	2,325	3,889
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	22,3	23,7	18,9	13,7	11,5
Ниже 20 копий [c] (абсолютный предел обнаружения этого метода)	21/22	0/28	0/28	0/28	0/28

[a] Выражается в процентах ГМО.
[b] Выражается как процент от среднего значения.
[c] Ниже 20 копий выражается как отношение числа оставшихся данных ниже 20 копий к суммарному числу оставшихся данных.

С.7.2.3 Молекулярная специфичность

С.7.2.3.1 Общие положения

Метод описан в [33]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, указана в [33] и [46]. Праймеры и зонды TaqMan® [57] для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, указанной в [46].

Если ДНК-конструкция, встроенная в Bt11, используется в других ГМ-событиях, может быть получен ложноположительный результат, поскольку амплифицируемая последовательность происходит из этой конструкции.

С.7.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных DDBJ [58] (3 декабря 1999 г.), и результаты по оценке безопасности были опубликованы Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства Японии с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [57]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.7.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании образцов высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии Bt11, которые были приготовлены для этого метода NFRI [33].

Для испытаний были использованы образцы зерен кукурузы, кукурузной крупы, кукурузной муки грубого и тонкого помола.

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторной системы со следующими нецелевыми видами/образцами: рисом (*Oryza sativa*), пшеницей (*Triticum aestivum*) и ячменем (*Hordeum vulgare*). Не наблюдали перекрестной реактивности с ГМ-соей линии GTS 40-3-2 и со следующими линиями ГМ-кукурузы – MON 810, Bt11, GA21 и T25.

С.7.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов проводилась с помощью СОП ABI PRISM 7700® [59] с использованием TaqMan®chemistry [59] [43].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [59].

С.7.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOD, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,5 % кукурузы линии Bt11.

С.7.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOQ, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,5 % кукурузы линии Bt11.

С.7.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

---

[57] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[58] DDBJ: DNA Data Bank of Japan (gost.e-ecolog.ru).

[59] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.7.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции кукурузы линии Bt11 размером 127 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары праймеров, специфических для Bt11. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции Bt11, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [59)].

Фрагмент последовательности таксон-специфической последовательности *zSSIIb* размером 151 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для *zSSIIb*, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для *zSSIIb*, производства TaqMan® [59)].

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой «праймер – зонд» генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые строились из пяти концентраций, включая 20, 125, 1 500, 20 000, 250 000 копий ДНК-плазмиды pMul5. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на СОП ABI PRISM® 7700 [59)] в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t, определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции Bt11 соответственно, от логарифма числа копий ДНК-плазмиды pMul5 [59)] [33] использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное для ДНК исследуемого образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества Bt11 в исследуемом образце число копий конструкции Bt11 делится на число копий гена *zSSIIb* и значение Cf, специфическую конструкцию Bt11, умноженную на 100 для получения процентов, как описано в С.7.9.

С.7.5 Реактивы

С.7.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.7.5.2 Вода

С.7.5.3 TaqMan® Universal Master Mix [60)] двукратный

С.7.5.4 Эталонный материал (плазмида)

Эталонным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5 [33], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ-кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981) [60)] [33]. Могут быть использованы и другие эталонные материалы, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.7.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфической конструкции линии Bt11 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.36.

[60)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.36 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5'	5'-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3'	500 нмоль/л
SSIIb 1-3'	5'-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3'	500 нмоль/л
SSIIb-Taq	5'-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
Bt11 3-5'	5'-AAA AgA CCA CAA CAA gCC gC-3'	500 нмоль/л
Bt11 3-3'	5'-CAA TgC gTT CTC CAC CAA gTA CT-3'	500 нмоль/л
Bt11-2-Taq	5'-FAM-CgA CCA Tgg ACA ACA ACC CAA ACA TCA-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ПЦР-продукта *SSIIb* составляет 151 п. о.; размер ПЦР-продукта Bt11 составляет 127 п. о.

С.7.6 Аппаратура

С.7.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.7.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован при проведении межлабораторных испытаний с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [61)]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.7.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [61)] соответственно. Могут быть использованы и другие реакционные пробирки, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.7.7 Порядок проведения ПЦР

С.7.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *zSSIIb* и для специфической целевой последовательности линии Bt11 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.37 для *zSSIIb* и С.38 для Bt11.

Таблица С.37 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb* (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*1-5' и *zSSIIb* 1-3' (см. таблицу С.36)	См. таблицу С.36
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.36)	См. таблицу С.36

[61)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.38 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации специфической последовательности Bt11 (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	Bt11 2-5' and Bt11 2-3' (см. таблицу С.36)	См. таблицу С.36
Зонд	Bt11-2-Taq (см. таблицу С.36)	См. таблицу С.36

С.7.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступны по крайней мере две альтернативы, а именно:

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы линии Bt11;

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность (и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 310-04981) [62)] [33].

С целью обеспечения качества контроля предпочтительно не использовать один и тот же материал в качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала.

С.7.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.39, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [62)]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix [62)]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.39 – Условия реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	59

С.7.8 Ограничения и оценка результатов

Если иная ГМ-кукуруза, чем кукуруза линии Bt11, содержит ту же самую специфическую конструкцию последовательности ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК-кукурузы линии Bt11 при отсутствии иных ГМО, чем кукуруза линии Bt11.

Приведенный метод пригоден только для определения соотношения последовательности специфической конструкции линии Bt11 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* кукурузы. Это соотношение отражает количество Bt11 в исследуемом образце кукурузы. Метод валидирован только для зерен кукурузы.

Межлабораторные испытания являются ценным источником данных для обеспечения оценки погрешности измерений. Также необходимо учитывать другие источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, например отбор проб и другие, в соответствии с международными требованиями [44], [45].

[62)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.7.9 Калибровка и расчет результатов

Специалистом должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t). Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве по эталонным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 319-04981) [63)]. См. также [33].

Cf для количественного определения конструкции, специфической для линии Bt11 и референсной плазмиды, использовавшихся в межлабораторных испытаниях, равен 0,50. Расчет количества ГМ-кукурузы в матриксе образца *w*, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \times \frac{100}{Cf},$$

где N_{GM} – число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца;

N_{TX} – число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца.

С.8 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии GA21 с использованием ПЦР в реальном времени

С.8.1 Введение

В настоящем приложении описан метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, IIb: *zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции – места соединения между оптимизированной последовательностью транзитного пептида и геном 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазы (m-*epsps*) кукурузы, присутствующего в ГМ-кукурузе линии GA21, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве эталонного материала для определения относительного количества GA21 с применением Cf, представляющего собой отношение числа копий специфической конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии GA21.

Примечание – Cf используется для расчета содержания ГМО в процентах (по массе) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. Cf может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего эталонного материала.

Ограничения см. в С.8.8.

С.8.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.8.2.1 Общие положения

Метод оптимизирован для приборов СОП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени [63)] с использованием плазмиды pMul5 в качестве эталонного материала [33]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS) и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

Примечание – Плазмида использовалась в качестве калибровочного материала для определения содержания ГМО, рассчитанного из относительного числа копий ГМ-специфической и таксон-специфической последовательностей ДНК.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием эталонных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержащих смеси зерен линии GA21 и обычной кукурузы [34].

Число копий таксон-специфической последовательности (*zSSIIb*) в расчете на геном оценивалось для 20 представительных разновидностей кукурузы.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [35], [36], [37], [38].

[63)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.8.2.2 Межлабораторные испытания

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержащих от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии GA21, были проанализированы пятнадцатью участниками.

Примечание 1 – Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для межлабораторных испытаний были использованы семена образца линии GA21, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [34], [39].

Валидация метода для кукурузы линии GA21 была проведена путем межлабораторных испытаний в соответствии с протоколом AOAC [39]. Межлабораторные испытания были организованы Национальным институтом исследования пищевых продуктов (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям (Saitama, Япония) и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences, Япония). Пятнадцать лабораторий, включая участников из Японии, Корейской Республики и Соединенных Штатов, проводили это совместное испытание с использованием СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [64)] в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Цель первой стадии – определение Cf для GA21. Все участники получили набор праймеров, зондов, эталонный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии GA21, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit [64)] и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции, специфической для GA21 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* ДНК-кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных.

Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми (r > 0,990). В соответствии с протоколом AOAC [39] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, p < 0,025) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, p < 0,025). Ни одного выброса не наблюдалось ни в одном из тестов, как это показано в таблице С.40.

Таблица С.40 – Итоговые результаты Cf для GA21

Целевая последовательность	Последовательность специфической конструкции GA21
Количество участвовавших лабораторий, шт.	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Количество оставшихся лабораторий, шт.	15
Cf [a]	1,40 ± 0,05
[a] Выражено как средняя ± доверительный интервал (α = 0,05).	

Значение Cf может быть повторно определено исследователями с использованием подходящих эталонных материалов кукурузы линии GA21.

На второй стадии были проведены «слепые» испытания. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии GA21 в смеси с обычной кукурузной мукой. Образец, содержащий 0 % кукурузы линии GA21, был использован как «холостой» образец, чтобы исключить некомпетентные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen. Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала (α = 0,05). Средние значения были определены как Cf для расчета количества ГМО в процентах в ходе «слепого» испытания. Среднее значение Cf для количественного определения последовательности специфической конструкции GA21 равно 1,40.

[64)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Четырнадцать лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации zSSIIb и последовательности специфической конструкции GA21. Лаборатории, которые не смогли определить «холостые» образцы с содержанием 0 % кукурузы линии GA21, были расценены как некомпетентные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми (r > 0,990). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных (выбросы по тесту Кохрана [40] и выбросы по тесту Граббса [41] соответственно) в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями GA21 были исключены из испытания еще перед статистическим анализом достоверности и точности.

В полученных данных было обнаружено два выброса по тесту Кохрана. Рассчитанное среднее значение, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости в процентах и относительное стандартное отклонение воспроизводимости в процентах для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.41 [34].

Примечание 2 – Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения Cf, определенного в ходе первого совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения Cf и проведении «слепых» испытаний, было передано в NFRI, и величины содержания ГМО в процентах в «слепых» исследуемых образцах были преобразованы в окончательные результаты с использованием значений Cf.

Таблица С.41 – Данные валидации для количественного определения последовательности специфической конструкции кукурузы GA21

	Доля ГМ-кукурузы линии GA21 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Количество участвовавших лабораторий, шт.	14	14	14	14	14
Количество исключенных лабораторий, шт.	1	1	1	1	1
Число выбросов по тесту Кохрана	1	0	0	1	0
Число выбросов по тесту Граббса	0	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключен-ия, шт.	12	13	13	12	13
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,5	1,2	5,8	11,5
Отклонение от истинного значения, %	−5,4	+7,7	+20,2	+16,6	+15,0
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,019	0,068	0,148	0,476	0,907
Предел повторяемости r [a] ($r = 2{,}8\ s_r$)	0,054	0,189	0,414	1,332	2,539
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	20,5	12,6	12,3	8,2	7,9
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,019	0,117	0,224	0,927	1,565
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2{,}8 \times s_R$)	0,055	0,329	0,627	2,597	4,382
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	20,6	21,8	18,6	15,9	13,6
Ниже 20 копий [c] (абсолютный предел обнаружения этого метода)	4/24	0/26	0/26	0/24	0/26

[a] Выражается в процентах ГМО.
[b] Выражается как процент от среднего значения.
[c] Ниже 20 копий выражается как отношение числа оставшихся данных ниже 20 копий к суммарному числу оставшихся данных.

С.8.2.3 Молекулярная специфичность

С.8.2.3.1 Общие положения

Метод описан в [33]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, указана в [33] и [46]. Праймеры и зонды TaqMan® [65)] для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, указанной в [46].

[65)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Если ДНК-конструкция, встроенная в GA21, используется в других ГМ-событиях, может быть получен ложноположительный результат, поскольку амплифицируемая последовательность происходит из этой конструкции.

С.8.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных DDBJ [66] (3 декабря 1999 г.), и результаты по оценке безопасности были опубликованы Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства Японии с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [65]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.8.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании образцов высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии GA21, которые были приготовлены для этого метода NFRI [33], [34].

Для испытаний были использованы образцы зерен кукурузы, кукурузной крупы, кукурузной муки грубого и тонкого помола.

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторной системы со следующими нецелевыми видами/образцами: рисом (*Oryza sativa*), пшеницей (*Triticum aestivum*) и ячменем (*Hordeum vulgare*). Не наблюдали перекрестной реактивности с ГМ-соей линии GTS 40-3-2 и со следующими линиями ГМ-кукурузы: MON 810, Event176, Bt11 и T25.

С.8.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов проводилась с помощью СОП ABI PRISM 7700® с использованием TaqMan®chemistry [65] [43].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.8.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOD, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,1 % кукурузы линии GA21.

С.8.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOQ, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,1 % кукурузы линии GA21.

С.8.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.8.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции кукурузы линии GA21 размером 133 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары праймеров, специфических для GA21. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции GA21, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [67].

---

[66] DDBJ: DNA Data Bank of Japan (gost.e-ecolog.ru).

[67] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Фрагмент последовательности таксон-специфической последовательности zSSIIb размером 151 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для *zSSIIb*, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для *zSSIIb*, производства TaqMan® [67)].

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой «праймер – зонд» генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые строились из пяти концентраций, включая 20, 125, 1 500, 20 000, 250 000 копий ДНК-плазмиды pMul5. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на СОП ABI PRISM® 7700 в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t, определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции GA21 соответственно, от логарифма числа копий ДНК-плазмиды pMul5 [33] использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное для ДНК исследуемого образца, определяется путем интерполяции по стандартным кривым. Для определения количества GA21 в исследуемом образце число копий конструкции GA21 делится на число копий гена *zSSIIb* и значение Cf, специфическую конструкцию Bt11, умноженную на 100 для получения процентов, как описано в С.8.9.

С.8.5 Реактивы

С.8.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.8.5.2 Вода

С.8.5.3 TaqMan® Universal Master Mix [67)] двукратный

С.8.5.4 Эталонный материал (плазмида)

Эталонным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5 [33], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ-кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981) [33] [67)]. Могут быть использованы и другие эталонные материалы, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.8.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфической конструкции линии GA21 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.42.

Таблица С.42 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5'	5'-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3'	500 нмоль/л
SSIIb 1-3'	5'-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3'	500 нмоль/л
SSIIb-Taq	5'-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
GA21 3-5'	5'-gAA gCC TCg gCA ACg TCA-3'	500 нмоль/л
GA21 3-3'	5'-ATC Cgg TTg gAA AgC gAC TT-3'	500 нмоль/л
GA21-2-Taq	5'-FAM-AAg gAT CCg gTg CAT ggC Cg-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ПЦР-продукта *SSIIb* составляет 151 п. о.; размер ПЦР-продукта GA21 составляет 133 п. о.

С.8.6 Аппаратура

С.8.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.8.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован при проведении межлабораторных испытаний с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [68]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.8.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [61] соответственно. Могут быть использованы и другие реакционные пробирки, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.8.7 Порядок проведения ПЦР

С.8.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *zSSIIb* и для специфической целевой последовательности линии GA21 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.43 для *zSSIIb* и С.44 для GA21.

Таблица С.43 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb* (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*1-5' и *zSSIIb* 1-3' (см. таблицу С.42)	См. таблицу С.42
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.42)	См. таблицу С.42

Таблица С.44 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации специфической последовательности GA21 (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	GA21 2-5' and GA21 2-3' (см. таблицу С.42)	См. таблицу С.42
Зонд	GA21-2-Taq (см. таблицу С.42)	См. таблицу С.42

С.8.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступны по крайней мере две альтернативы, а именно:

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы линии GA21;

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность (и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 310-04981) [89] [33].

С целью обеспечения качества контроля предпочтительно не использовать один и тот же материал в качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала.

---

[68] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.8.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.45, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В валидационном исследовании она использовалась совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.45 – Условия реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

С.8.8 Ограничения и оценка результатов

Если иная ГМ-кукуруза, чем кукуруза линии GA21, содержит ту же самую специфическую конструкцию последовательности ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК-кукурузы линии GA21 при отсутствиие иных ГМО, чем кукуруза линии GA21.

Приведенный метод пригоден только для определения соотношения последовательности специфической конструкции линии GA21 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* кукурузы. Это соотношение отражает количество GA21 в исследуемом образце кукурузы. Метод валидирован только для зерен кукурузы.

Межлабораторные испытания являются ценным источником данных для обеспечения оценки погрешности измерений. Также необходимо учитывать другие источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, например отбор проб и другие, в соответствии с международными требованиями [44], [45].

С.8.9 Калибровка и расчет результатов

Специалистом должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t).

Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве по эталонным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 319-04981) [69]. См. также [33].

Cf для количественного определения конструкции, специфической для линии GA21 и референсной плазмиды, использовавшихся в межлабораторных испытаниях, равен 1,40. Расчет количества ГМ-кукурузы в матриксе образца *w*, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \times \frac{100}{Cf},$$

где N_{GM} – число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца;

N_{TX} – число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца.

С.9 Метод специфической конструкции для количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии Т25 с использованием ПЦР в реальном времени

С.9.1 Введение

В настоящем приложении описан метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, IIb: *zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции – места соединения между последовательностью промотора вируса мозаики цветной капусты и синтетическим геном фосфинотрицинацетилтрансферазы (*pat*), происходящего из *Streptomyces viridochromogenes* и присутствующего в ГМ-кукурузе линии Т25, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве эталонного материала для определения относительного количества Т25 с применением Cf, представляющего собой отношение числа копий специ-

фической конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии Т25.

Примечание – Cf используется для расчета содержания ГМО в процентах (по массе) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. Cf может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего эталонного материала.

Ограничения см. в С.9.8.

С.9.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.9.2.1 Общие положения

Метод оптимизирован для приборов СОП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени [69] с использованием плазмиды pMul5 в качестве эталонного материала [33]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS) и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и Т25.

Примечание – Плазмида использовалась в качестве калибровочного материала для определения содержания ГМО, рассчитанного из относительного числа копий ГМ-специфической и таксон-специфической последовательностей ДНК.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием эталонных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержавших смеси зерен линии Т25 и обычной кукурузы [34].

Число копий таксон-специфической последовательности (*zSSIIb*) в расчете на геном оценивалось для 20 представительных разновидностей кукурузы.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [35], [36], [37], [38].

С.9.2.2 Межлабораторные испытания

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержащих от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии Т25, были проанализированы пятнадцатью участниками.

Примечание 1 – Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для межлабораторных испытаний были использованы семена образца линии Т25, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [34], [39].

Валидация метода для кукурузы линии Т25 была проведена путем межлабораторных испытаний в соответствии с протоколом AOAC [39]. Межлабораторные испытания были организованы Национальным институтом исследования пищевых продуктов (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям (Saitama, Япония) и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences, Япония). Пятнадцать лабораторий, включая участников из Японии, Корейской Республики и Соединенных Штатов, проводили это совместное испытание с использованием СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [69] в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Цель первой стадии – определение Cf для Т25. Все участники получили набор праймеров, зондов, эталонный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии Т25, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit [70] и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции, специфической для Т25 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* ДНК-кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были

[69] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[70] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

приемлемыми (r > 0,990). В соответствии с протоколом AOAC [39] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, p < 0,025) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, p < 0,025). Ни одного выброса не наблюдалось ни в одном из тестов, как это показано в таблице С.46.

Таблица С.46 – Итоговые результаты Cf для T25

Целевая последовательность	Последовательность специфической конструкции T25
Количество участвовавших лабораторий, шт.	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Количество оставшихся лабораторий, шт.	15
Cf [a]	0,34 ± 0,01
[a] Выражено как средняя ± доверительный интервал (α = 0,05).	

Значение Cf может быть повторно определено исследователями с использованием подходящих эталонных материалов кукурузы линии T25.

На второй стадии были проведены «слепые» испытания. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии T25 в смеси с обычной кукурузной мукой. Образец, содержащий 0 % кукурузы линии T25, был использован как «холостой» образец, чтобы исключить некомпетентные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen. Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала (α = 0,05). Средние значения были определены как Cf для расчета количества ГМО в процентах в ходе «слепого» испытания. Среднее значение Cf для количественного определения последовательности специфической конструкции T25 равно 0,34.

Четырнадцать лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности специфической конструкции T25. Лаборатории, которые не смогли определить «холостые» образцы с содержанием 0 % кукурузы линии T25, были расценены как некомпетентные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми (r > 0,990). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных (выбросы по тесту Кохрана [40] и выбросы по тесту Граббса [41] соответственно) в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями T25, были исключены из испытания еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных было обнаружено два выброса по тесту Кохрана. Рассчитанное среднее значение, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости в процентах и относительное стандартное отклонение воспроизводимости в процентах для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.47.

Примечание 2 – Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения Cf, определенного в ходе первого совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения Cf и проведении «слепых» испытаний, было передано в NFRI, и величины содержания ГМО в процентах в «слепых» исследуемых образцах были преобразованы в окончательные результаты с использованием значений Cf.

Таблица С.47 – Данные валидации для количественного определения последовательности специфической конструкции кукурузы Т25

	Доля ГМ-кукурузы линии Т25 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Количество участвовавших лабораторий, шт.	14	14	14	14	14
Количество исключенных лабораторий, шт.	0	0	0	0	0
Число выбросов по тесту Кохрана	2	0	1	0	0
Число выбросов по тесту Граббса	1	0	0	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	11	14	13	14	14
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,6	1,2	5,6	10,8
Отклонение от истинного значения	+38,6	+15,3	+20,0	+11,6	+8,1
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,033	0,162	0,082	0,690	1,439
Предел повторяемости r [a] ($r = 2{,}8\ s_r$)	0,092	0,455	0,228	1,932	4,030
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	23,7	28,2	6,8	12,4	13,3
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,037	0,162	0,138	0,827	1,591
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2{,}8 \times s_R$)	0,103	0,455	0,386	2,317	4,456
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	26,5	28,2	11,5	14,8	14,7
Ниже 20 копий [c] (абсолютный предел обнаружения этого метода)	22/22	1/28	0/26	0/28	0/28

[a] Выражается в процентах ГМО.
[b] Выражается как процент от среднего значения.
[c] Ниже 20 копий выражается как отношение числа оставшихся данных ниже 20 копий к суммарному числу оставшихся данных.

С.9.2.3 Молекулярная специфичность

С.9.2.3.1 Общие положения

Метод описан в [33]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, указана в [33] и [46]. Праймеры и зонды TaqMan® [71)] для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, указанной в [46].

Если ДНК-конструкция, встроенная в Т25, используется в других ГМ-событиях, может быть получен ложноположительный результат, поскольку амплифицируемая последовательность происходит из этой конструкции.

С.9.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных [71)] DDBJ [72)] (3 декабря 1999 г.), и результаты по оценке безопасности были опубликованы Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства Японии с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 [71)]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.9.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании образцов высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии Т25, которые были приготовлены для этого метода NFRI [33], [34].

Для испытаний были использованы образцы зерен кукурузы, кукурузной крупы, кукурузной муки грубого и тонкого помола.

[71)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[72)] DDBJ: DNA Data Bank of Japan (gost.e-ecolog.ru).

Проведенные перед межлабораторными испытаниями тесты на специфичность показали отсутствие перекрестной реактивности детекторной системы со следующими нецелевыми видами/образцами: рисом (*Oryza sativa*), пшеницей (*Triticum aestivum*) и ячменем (*Hordeum vulgare*). Не наблюдали перекрестной реактивности с ГМ-соей линии GTS 40-3-2 и со следующими линиями ГМ-кукурузы: MON 810, Event176, Bt11 и GA21.

С.9.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов проводилась с помощью СОП ABI PRISM 7700® [73] с использованием TaqMan®chemistry [73] [43].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems) [73].

С.9.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOD, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,5 % кукурузы линии Т25.

С.9.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – 20 копий плазмид эталонного материала [33].

Относительный LOQ, валидированный в ходе межлабораторных испытаний, – 0,5 % кукурузы линии Т25.

С.9.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

С.9.4 Принцип метода

Фрагмент последовательности специфической конструкции кукурузы линии Т25 размером 149 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР-пары праймеров, специфических для Т25. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции Т25, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся TaqMan® chemistry [73].

Фрагмент последовательности таксон-специфической последовательности *zSSIIb* размером 151 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических для *zSSIIb*, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического для *zSSIIb*, производства TaqMan® [73].

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного исследуемого образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой «праймер – зонд» генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые строились из пяти концентраций, включая 20, 125, 1 500, 20 000, 250 000 копий ДНК-плазмиды pMul5. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на СОП ABI PRISM® 7700 [74] в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t, определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции Т25 соответственно, от логарифма числа копий ДНК-плазмиды pMul5 использовали для построения калибровочной кривой. См. также [33]. Число копий, определенное для ДНК исследуемого образца, определяется путем интерполяции по стандартным

---

[73] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[74] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

кривым. Для определения количества Т25 в исследуемом образце число копий конструкции Т25 делится на число копий гена *zSSIIb* и значение Cf, специфическую конструкцию Т25, умноженную на 100 для получения процентов, как описано в С.9.9.

С.9.5 Реактивы

С.9.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

С.9.5.2 Вода

С.9.5.3 TaqMan® Universal Master Mix [74] двукратный

С.9.5.4 Эталонный материал (плазмида)

Эталонным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5, которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ-кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981) [74]. Могут быть использованы и другие эталонные материалы, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

С.9.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфической конструкции линии Т25 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.48.

Таблица С.48 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5'	5'-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3'	500 нмоль/л
SSIIb 1-3'	5'-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3'	500 нмоль/л
SSIIb-Taq	5'-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3' [a]	200 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
T25 1-5'	5'-gCC AgT TAg gCC AgT TAC CCA-3'	500 нмоль/л
T25 1-3'	5'-TgA gCg AAA CCC TAT AAg AAC CCT-3'	500 нмоль/л
T25-2-Taq	5'-FAM-TgC Agg CAT gCC CgC TgA AAT C-TAMRA-3'	200 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин,TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ПЦР-продукта SSIIb составляет 151 п. о.; размер ПЦР-продукта Т25 составляет 149 п. о.

С.9.6 Аппаратура

С.9.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

С.9.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль первоначально был протестирован при проведении межлабораторных испытаний с прибором СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [75]. Могут использоваться другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.9.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [75] соответственно. Могут быть использованы и другие реакционные пробирки, обеспечивающие достижение таких же или лучших результатов.

[75] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

С.9.7 Порядок проведения ПЦР

С.9.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *zSSIIb* и для специфической целевой последовательности линии Т25 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблицах С.49 для *zSSIIb* и С.50 для Т25.

Таблица С.49 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb* (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*1-5' и *zSSIIb* 1-3' (см. таблицу С.48)	См. таблицу С.48
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.48)	См. таблицу С.48

Таблица С.50 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации специфической последовательности Т25 (на одну реакционную пробирку)

Суммарный реакционный объем		25 мкл
ДНК-матрица (50 нг геномной ДНК-кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	Т25 1-5' and Т25 1-3' (см. таблицу С.48)	См. таблицу С.48
Зонд	Т25-2-Taq (см. таблицу С.48)	См. таблицу С.48

С.9.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступны по крайней мере две альтернативы, а именно:

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы линии Т25;

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность (и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 310-04981) [76]. См. также [33].

С целью обеспечения качества контроля предпочтительно не использовать один и тот же материал в качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала.

С.9.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.51, была оптимизирована для СОП ABI PRISM® [76] 7700 (Applied Biosystems) [76]. В валидационном исследовании она использовалась совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix [76]. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

[76] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица С.51 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	59

С.9.8 Ограничения и оценка результатов

Если иная ГМ-кукуруза, чем кукуруза линии Т25, содержит ту же самую специфическую конструкцию последовательности ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК-кукурузы линии Т25 при отсутствии иных ГМО, чем кукуруза линии Т25.

Приведенный метод пригоден только для определения соотношения последовательности специфической конструкции линии Т25 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb* кукурузы. Это соотношение отражает количество Т25 в исследуемом образце кукурузы. Метод валидирован только для зерен кукурузы.

Межлабораторные испытания являются ценным источником данных для обеспечения оценки погрешности измерений. Также необходимо учитывать другие источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, например отбор проб и другие в соответствии с международными требованиями [44], [45].

С.9.9 Калибровка и расчет результатов

Специалистом должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t).

Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве по эталонным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 319-04981) [76)]. См. также [33].

Cf для количественного определения конструкции, специфической для линии Т25 и референсной плазмиды, использовавшихся в межлабораторных испытаниях, равен 0,34. Расчет количества ГМ-кукурузы в матриксе образца *w*, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \times \frac{100}{Cf},$$

где N_{GM} – число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца;

N_{TX} – число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК исследуемого образца.

Приложение D
(справочное)

Методы специфического события

D.1 Метод специфического события для абсолютного и относительного количественного определения содержания кукурузы линии Bt11 с использованием ПЦР в реальном времени

D.1.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и количественного определения ДНК ГМ-кукурузы (*Zea mays*) в пищевых продуктах. Метод обеспечивает получение концентрации в абсолютном числе копий и для расчета относительной концентрации ДНК Bt11 в пищевых продуктах должен быть скомбинирован с методом, специфическим для целевого таксона для кукурузы (см. A.1.). Описан также расчет относительных значений.

Ограничения см. в D.1.8.

D.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

D.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для ДНК, экстрагированной из чистых размолотых зерен кукурузы линии Bt11, листьев кукурузы Bt11 и СЭМ высушенной муки (IRMM-412 [77)]) [10] из размолотых зерен кукурузы Bt11, состоящих из смеси ГМ-кукурузы Bt11 и обычной кукурузы.

Воспроизводимость описанных методов была проверена в ходе межлабораторных испытаний с использованием двенадцати неизвестных образцов (шести пар «слепых» дубликатов), состоящих из смеси 100 % ДНК-кукурузы Bt11 и ДНК дикого типа кукурузы с различным числом копий целевой последовательности.

Показано, что число копий целевой последовательности в расчете на гаплоидный геном составляет 1 [47].

Метод был первоначально опубликован [47] для LightCycler® thermal cyclers (Roche Diagnostics) и позже был модифицирован [15] с целью адаптации для СОП ABI PRISM® 7700/7900 перед валидацией путем межлабораторных испытаний. Модифицированный протокол представлен здесь.

D.1.2.2 Межлабораторные испытания

Метод был валидирован в ходе межлабораторных испытаний Европейской комиссией, Совместным исследовательским центром, Институтом здоровья и защиты потребителей (ИЗЗП) и Сообществом арбитражных лабораторий [16]. Межлабораторные испытания включали использование стандартной системы для гена *adh*1, описанной в A.1.

Были использованы образцы, содержавшие дикий тип сладкой кукурузы и сладкую кукурузу Bt11, при разных концентрациях ДНК. Образцы ДНК не модифицированной генетически кукурузы и 100%-ной сладкой кукурузы Bt11 были получены от компании Syngenta. Использовавшийся метод экстракции ДНК был основан на лизирующем растворе Magnesil и магнитном разделении ДНК. Особеннности препаратов ДНК были следующими:

– геномная ДНК дикого типа из листьев гибридной полевой кукурузы (Brasco);

– геномная ДНК из зерен сладкой кукурузы Bt11 (GH0937).

Стандартная кривая, контрольный и неизвестный образцы были изготовлены ИЗЗП. Материал кукурузы, содержащий 2,5 % кукурузы Bt11, был использован для приготовления пяти образцов (S1 – S5), содержащих известные концентрации целевой последовательности, специфической для кукурузы Bt11, со следующими абсолютными количествами копий S1: 2387; S2: 1183; S3: 592; S4: 148; S5: 49, которые были применены для построения калибровочной кривой для абсолютной количественной оценки числа копий Bt11 в неизвестных образцах. Для подробностей валидации с последовательностью *adh*1 см. также D1. Абсолютное число копий в известных образцах определяли путем деления массы ДНК образца (определенного флуорометрической количественной оценкой двухцепочечной

[77)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

ДНК с помощью PicoGreen, Molecular Probes, кат. № P-7589) на опубликованную величину 1С для кукурузного генома (2,725 пг) [14].

Двенадцать неизвестных образцов (шесть пар «слепых» дубликатов U1 – U12) кукурузной ДНК, содержащих от 77 до 1541 копии кукурузы Bt11, были проанализированы участниками на двух ПЦР-пробирках. Число копий соответствовало содержанию Bt11 от 0,1 % до 2,0 %. Образцы были приготовлены путем смешивания ДНК 100%-ной кукурузы Bt11 с ДНК кукурузы дикого типа с различными соответствующими числами копий целевой последовательности. Кроме того, были использованы два отрицательных целевых контроля ДНК (дикого типа и кукурузы Bt176) и контроль на амплификационный реагент (вода, не содержащая нуклеиновых кислот).

Для эталонной кривой и контрольных образцов ПЦР в реальном времени была проведена трижды, а для неизвестных образцов – четырежды.

Первоначально 14 лабораторий из девяти различных стран Евросоюза участвовали в межлабораторных испытаниях. Использовалось оборудование СОП ABI PRISM® 7700/7900 и ABI PRISM® 7000. Результаты, полученные одной из лабораторий, были исключены из анализа данных вследствие того, что смесь Master Mix, приведенная в протоколе, в ходе анализа не использовалась. После этого выбросы были оценены с использованием теста Кохрана и тестов Граббса в соответствии с согласованным протоколом IUPAC [12].

Для относительного количественного определения в сочетании с кукурузной системой *adh*1 (см. A.1) система обнаружения, специфическая для Bt11, дала относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 12,7 % до 33,5 % для относительного количественного определения (таблица D1). Подробности межлабораторных испытаний см. в таблице D.1.

Поскольку образцы U1 – U12 представляли собой смеси той же самой ДНК, что и ДНК, использовавшаяся для приготовления образцов S1 – S5, результаты, полученные с этими образцами, не могут быть использованы для оценки истинности предложенного метода ПЦР в реальном времени.

Таблица D.1 – Данные валидации специфического для кукурузы Bt11 относительного количественного определения с *adh*1 в качестве эталонного гена

	Уровень смешивания					
	0,1 %	0,3 %	0,7 %	1,0 %	1,3 %	2,0 %
Год проведения межлабораторных испытаний	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Количество лабораторий, имевших возвратные результаты, шт.	13	13	13	13	13	13
Количество образцов на лабораторию, шт.	2	2	2	2	2	2
Количество исключенных лабораторий, шт.	2	2	1	3	1	3
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	11	11	12	10	12	10
Количество принятых образцов, шт.	22	22	24	20	24	20
Ожидаемое значение, %	0,1	0,3	0,7	1,0	1,3	2,0
Среднее значение, %	0,1	0,3	0,7	1,0	1,2	1,8
Среднее линейное значение, %	0,1	0,3	0,7	1,0	1,2	1,9
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	33,5	19,0	24,4	12,7	27,0	18,4
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$)	0,11	0,17	0,48	0,36	0,92	0,95

D.1.2.3 Молекулярная специфичность

D.1.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой последовательности, описанной, например, в EMBL/GenBank/DDBJ [78)], регистрационный номер AY 123624 [47]. Эта последовательность состоит из части генома *Zea mays* (кукурузы) и части встроенной генетической конструкции, интегрированной в ГМ-кукурузу Bt11.

[78)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

D.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов оценена путем поиска в базах данных GenBank/EMBL/DDBJ [78)] с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3 на gost.e-ecolog.ru [9 октября 2003]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями. Представленный праймер и зонд TaqMan® [78)] на 100 % совпадают с внутренней частью плазмиды pUC18 (регистрационный номер L08752) и, следовательно, отыщут много синтетических последовательностей ДНК.

Обратный праймер перекрывает 3'-граничный район соединения Bt11, т. е. соединение между встроенной (последовательность, происходящая из pUC18) и хозяйской геномной ДНК (высокая гомология последовательности с номером доступа AF030935, специфичная для кукурузы размером 180 п.о.). Этот праймер отыскивает только цель с номером доступа AY123624 [47] со 100%-ным совпадением и четыре мышиных и человеческих клона с 17 совпадениями нуклеотидов из 20 нуклеотидов.

D.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Специфичность была протестирована против ДНК, экстрагированной из других доступных СЭМ ГМ-растений (серий IRMM-410R [соя GTS 40-3-2], IRMM-411 [кукуруза Bt176] и IRMM-413 [кукуруза Mon810]) [78)] и против чистой ДНК клонируемого вектора pUC18 в концентрациях до 1×10^9. Ни один из СЭМ не дал детектируемой амплификации, и ДНК pUC18 не была детектируемой при ПЦР с менее чем 1×10^9 копий кодирующей ДНК [47].

Целевая последовательность является единственной копией последовательности в гаплоидном геноме Bt11.

D.1.2.4 Оптимизация

Метод был первоначально описан для LightCycler® и TaqMan®chemistry [78)], адаптирован и оптимизирован для СОП ABI PRISM® 7700/7900 еще до проведения валидации в межлабораторных испытаниях [15]. Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения OLIGO-Applet software (TIB-MOLBIOL, Germany) [78)].

D.1.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD в соответствии с указаниями разработчика метода – 10 копий целевой последовательности [47].

Наименьшее число копий целевой последовательности, вошедшее в межлабораторные испытания, было 77.

Наименьшая относительная концентрация целевой последовательности, включенная в межлабораторные испытания, составила 0,1 %.

D.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода – между 40 и 100 копиями целевой последовательности [47].

Наименьшее число копий целевой последовательности, вошедшее в межлабораторные испытания, было 77.

Наименьшая относительная концентрация целевой последовательности, включенная в межлабораторные испытания, составила 0,1 %.

D.1.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

D.1.4 Принцип метода

Фрагмент размером 70 п. о. последовательности, специфической для события кукурузы Bt11, 3'-граничный район соединения, был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием пары специфических праймеров: прямого целевого праймера – последовательности из плазмиды pUC18 (внутренней по отношению к вставленной последовательности ДНК) и обратного целевого праймера – 3'-граничного района соединения (11 нуклеотидов из последовательности плазмиды pUC18 и 9 нуклеотидов из кукурузного генома). Накопление ПЦР-продуктов измерялось в конце каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью специфического олигонуклеотидного зонда (100 % совпадения с последовательностью из плазмиды pUC18), помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM

в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя. Для этих целей применялся набор TaqMan® chemistry [79)].

Измеренный сигнал флуоресценции превышает определенное пользователем пороговое значение после определенного числа циклов. Это число называется значением C_t. Для количественной оценки содержания Bt11-ДНК в неизвестном образце значение C_t преобразовано в значение, соответствующее числу копий путем сравнения с калибровочной кривой, чьи значения C_t напрямую связаны с известными числами копий (регрессионный анализ).

Сходная амплификация была произведена для целевой последовательности, представляющей кукурузу, например *adh*1 (см. A.1). Для определения относительного количества сравнивается число копий Bt11 и целевой последовательности кукурузы, см. D.1.9.

D.1.5 Реактивы

D.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

D.1.5.2 Вода

D.1.5.3 ПЦР-буфер (без $MgCl_2$) 10-кратный

D.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, *c* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

D.1.5.5 Раствор дНТФ, *c* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л (каждый)

D.1.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице D.2.

Таблица D.2 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Bt113JFor	5'-gCg gAA CCC CTA TTT gTT TA-3'	750 нмоль/л
Bt113Jrev	5'-TCC AAg AAT CCC TCC ATg Ag-3'	750 нмоль/л
Bt113JFT	5'-FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TgT ATC CgC TCA-TAMRA-3' [a]	250 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин. Размер ампликона кукурузы Bt11 составляет 70 п. о.		

Для эталонного гена необходим отдельный набор праймеров и зондов, см., например, A.1 для кукурузного гена *adh*1.

D.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [80)].

D.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

D.1.5.9 Реакционная смесь амплификации

Подробности о реакционной смеси амплификации приведены в таблице D.3.

[79)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[80)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица D.3 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (≤ 250 нг ДНК-кукурузы для эталонов, максимум 200 нг для неизвестных образцов)		5 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,5 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	200 мкмоль/л 0,3 ед.
Реакционный буфер	Буфер A TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	4 ммоль/л
Праймеры	См. D.1.6.1	См. D.1.6.1
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонды	См. D.1.6.1	См. D.1.5.6
[a] ROX – карбокси-Х-родамин.		

Для эталонного гена необходима отдельная реакция, см., например, А.1 для кукурузного гена *adh*1.

D.1.6 Аппаратура

D.1.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

D.1.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль изначально был протестирован с прибором СОП ABI PRISM® 7700/7900 (Applied Biosystems). Могут использоваться другие системы СОП ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции. Метод первоначально был разработан и опубликован для LightCycler® [80] [47].

D.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере реального времени, например MicroAmp® optical tubes 96-well reaction plate (Applied Biosystems). Метод первоначально был разработан и опубликован для LightCycler® и стеклянных капилляров [80] [47].

D.1.7 Порядок проведения ПЦР

D.1.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности эталонного гена и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 50 мкл и реактивами, список которых приведен в таблице D.3.

Он был оптимизирован для СОП ABI PRISM® 7700/7900 [81] (Applied Biosystems). Подробности приведены в таблице D.3.

D.1.7.2 Контроль ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все виды контроля в соответствии с ISO 24276.

Если результаты контроля отличаются от ожидаемых, испытание повторяют.

В качестве положительного контроля/эталонного калибровочного материала доступна по крайней мере одна альтернатива, а именно:

– высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы Bt11 (например, серии CRM IRMM-412) [81], может быть использована, если количество ДНК известно (например, определено с помощью PicoGreen, как описано в А.1.2.2) на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы [15].

---

[81] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

D.1.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице D.4, была адаптирована для СОП ABI PRISM® 7700/7900 (Applied Biosystems) и была модифицирована из программы, первоначально опубликованной для LightCycler® [81]. Для предложения подходящих реактивов и концентраций для LightCycler® [81] проконсультируйтесь с оригинальной публикацией [47].

Таблица D.4 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (50 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

D.1.8 Ограничения и оценка результатов

Присутствие ингибиторов ПЦР может оказать сильное влияние на точность определения числа копий Bt11 в исследуемых образцах. Поэтому отсутствие обнаруженных количеств ингибиторов ПЦР должно быть удостоверено (см. также ISO 21571, в котором приведены методы экстракции ДНК), например, путем серии разбавлений ДНК-матрицы и определения соответствия между разбавлениями и различиями в значениях C_t (например, одна C_t соответствует удваивающимся концентрациям ДНК).

Для проведения оценки наличия ингибиторов ПЦР перед количественным определением Bt11 может быть использован подходящий целевой таксон-специфический метод [см., например, А.1 (кукурузный ген *adh*1)].

При определении относительного количества ГМО в неизвестных образцах, т. е. при использовании этого метода в сочетании с методом, специфическим для целевого таксона, таким как приведенный в приложении А.1, важно, чтобы абсолютное количество кодирующей ДНК (нг) было бы тем же самым, как в ПЦР, специфической для целевого таксона, так и в ПЦР, специфической для ГМО. Если это будет не так, то абсолютные числа копий в этих реакциях не могут сравниваться напрямую и потребуется выравнивание соответствующих значений числа копий. В противном случае относительная концентрация ГМО не может быть рассчитана.

D.1.9 Калибровка и расчет результатов

Калибровочные точки получают с применением эталонов, состоящих из определенного количества (в абсолютных числах копий) геномной ДНК-кукурузы Bt11, содержащей целевую последовательность.

Калибровочную кривую получают путем построения графика зависимости значений C_t от логарифма числа копий целевой последовательности для калибровочной точки. Это может быть сделано, например, с помощью программного обеспечения (электронной таблицы), такого как Microsoft Excel [82], или напрямую с использованием опций, доступных в программном обеспечении СОП.

Для определения концентрации кукурузы Bt11 (в абсолютных числах копий) в неизвестных образцах используется калибровочная кривая. Несмотря на то, что ДНК образцов может быть деградирована вследствие приготовления пищи или может содержать иные, чем кукуруза, ингредиенты, это не повлияет на рассчитанную концентрацию кукурузы Bt11 (в абсолютных числах копий) в неизвестных образцах. Для относительной количественной оценки гаплоидное определение содержания ГМО w, %, производится по формуле

$$w = \frac{N_{\text{Bt11}}}{N_{\text{кукурузы}}} \times 100,$$

где N_{Bt11} – абсолютное число копий Bt11-специфической целевой последовательности (определенное представленным методом);

$N_{\text{кукурузы}}$ – абсолютное число копий целевой таксон-специфической последовательности (определенное методом для кукурузы, например, описанным в приложении А.1).

[82] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

D.2 Метод специфического события для относительного количественного определения содержания ДНК-кукурузы линии MON 810 с использованием ПЦР в реальном времени

D.2.1 Введение

В настоящем приложении описан метод специфической амплификации и количественного определения специфического участка, состоящего из таксон-специфического гена (гена белка группы высокой мобильности [*hmg*] [48]) кукурузы (*Zea mays*) и единственной копии ДНК из района граничного соединения геномной последовательности и элемента встроенной последовательности, происходящего из вируса мозаики цветной капусты (35S-промотора CaMV), получившегося в результате рекомбинации *in-vitro*, который присутствует в ГМ-устойчивой к насекомым кукурузе MON 810 (YieldGuard, Monsanto), с целью оценки относительного количества ДНК-кукурузы MON 810.

Ограничения см. в D.2.8.

D.2.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

D.2.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для СЭМ (СЭМ IRMM-413) [49], состоящего из высушенной кукурузной муки, содержащей смеси ГМ-кукурузы MON 810 и обычной кукурузы.

Воспроизводимость и точность описанного метода были проверены в ходе межлабораторных испытаний с использованием серий разбавлений СЭМ IRMM-413.

Число копий целевых генов в расчете на геном определено не было.

Метод был первоначально разработан для СОП ABI PRISM® 7700 [83)].

D.2.2.2 Межлабораторные испытания

Метод был валидирован в ходе межлабораторных испытаний Федеральным институтом оценки рисков совместно с Американской ассоциацией химиков зерна, Совместным исследовательским центром Еврокомиссии, Институтом эталонных материалов и измерений, Институтом здоровья и защиты потребителей. Совместное испытание было организовано таким образом, чтобы оно удовлетворяло критериям, изложенным в согласованном протоколе IUPAC [12].

Исследование было предпринято 15 лабораториями, использующими ABI PRISM® 7700, ABI PRISM® 7900 (Applied Biosystems) [83)] или iCycler iQ-систему обнаружения ПЦР в реальном времени (Bio-Rad Laboratories).

Четырнадцать лабораторий сообщили результаты.

В соответствии с инструкциями производителя для экстракции ДНК используется ДНК-экстракционная система GENE*Spin* (GeneScan) [83)].

Для каждого неизвестного образца была предпринята одна экстракция ДНК. Каждый исследуемый образец был проанализирован с помощью ПЦР трижды.

Каждый участник получил 12 неизвестных образцов. Образцы состояли из шести СЭМ (СЭМ IRMM-413), содержащих от < 0,02 % до 5,0 % ГМ-кукурузы MON 810 (по массе) в смеси с обычной кукурузой.

Межлабораторные испытания были спланированы как двойные «слепые» испытания. Каждая лаборатория получила каждую из концентраций СЭМ ГМ-кукурузы MON 810 в двух неизвестных образцах.

Подробности межлабораторных испытаний приведены в таблице D.5.

[83)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица D.5 – Данные валидации количественного определения, специфического для трансформационного события MON 810

	Образец 1 < 0,02 %	Образец 2 0,10 ± 0,03 %	Образец 3 0,50 % ± ± 0,04 %	Образец 4 1,00 ± 0,05 %	Образец 5 2,0 ± 0,1 %	Образец 6 5 %
Год проведения межлабораторных испытаний	2003/2004	2003/2004	2003/2004	2003/2004	2003/2004	2003/2004
Количество лабораторий, приславших результаты, шт.	11	14	14	14	14	14
Количество исключенных лабораторий, шт. [a]	1	1	0	2	0	0
Количество лабораторий, оставшихся после исключения, шт.	10	13	14	12	14	14
Среднее значение, %	0,028	0,102 3	0,461 3	0,832 7	1,781 4	4,515 4
Стандартное отклонение повторяемости s_R	0,007 36	0,036 41	0,960 6	0,137 44	0,283 85	1,293 74
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	26,27	35,60	20,82	16,51	15,93	28,65
Предел повторяемости r ($r = 2{,}8\ s_r$)	0,020 6	0,101 9	0,269	0,384 8	0,794 8	3,622 5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R	0,023 26	0,046 46	0,200 68	0,265 34	0,566 09	1,654 51
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	83,03	45,43	43,5	31,86	31,78	36,64
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$)	0,065 1	0,130 1	0,561 9	0,743	1,585 1	4,632 6
[a] Выбросы идентифицировали с помощью тестов Кохрана и Граббса.						

D.2.2.3 Молекулярная специфичность

D.2.2.3.1 Общие положения

Наборы праймеров были разработаны для амплификации последовательности ДНК, специфической для искусственного соединения (района граничного соединения), между интегрированной генетической конструкцией и хозяйским геномом, которая в природе не встречается.

D.2.2.3.2 Теоретическая специфичность

Никакой гомологии последовательностей с последовательностями не модифицированной генетически кукурузы и других сельскохозяйственных растений не было обнаружено путем поиска в базах данных (база данных GenBank®; BlastN® 2.2.1, поиск от 1 октября 2003 г.) [84)]. Результат поиска с помощью программы BLASTN [84)] на gost.e-ecolog.ru [14 сентября 2004 г.] дал 100%-ное совпадение с последовательностью с номером доступа AF434709, описывающей специфический для MON 810 участок интеграции в кукурузном геноме.

D.2.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Идентифицировали СЭМ IRMM-413 высушенной кукурузной муки [84)], содержащей от < 0,02 % до 5,0 % ГМ-кукурузы линии MON 810.

Тесты на специфичность, проведенные перед исследованием, показали отсутствие перекрестной реактивности систем обнаружения к следующим нецелевым видам/образцам: ДНК-сои.

Не обнаружено перекрестной реактивности со следующими трансформационными событиями ГМ-кукурузы: Event176, Bt11, T25, GA21 и сои GTS 40-3-2.

[84)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

D.2.2.4 Оптимизация

Оптимизация концентраций реактивов была произведена для СОП ABI PRISM® 7700 и СОП GenAmp 5700 с использованием TaqMan®chemistry [85)].

Расчет праймера и зонда проводился с применением программного обеспечения Primer Express® software (Applied Biosystems) [85)].

D.2.2.5 Предел обнаружения (LOD)

Абсолютный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода абсолютный LOD, как это определено в ISO 24276, составляет пять копий целевой последовательности.

Относительный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода относительный LOD, как это определено в ISO 24276, составляет по крайней мере 0,1 %.

D.2.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что абсолютный предел количественного определения составляет 10 копий целевой последовательности.

Относительный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что относительный предел количественного определения составляет по крайней мере 0,1 % (равно точке наименьшей концентрации на использовавшейся калибровочной кривой).

D.2.3 Адаптация

Конкретная информация отсутствует.

D.2.4 Принцип метода

Фрагмент размером 92 п. о. последовательности, специфической для кукурузы линии MON 810, был амплифицирован с помощью ПЦР. Накопленные ПЦР-продукты измеряли в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью специфического для целевой последовательности олигонуклеотидного зонда, помеченного двумя флуоресцентными красителями: FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве тушителя [30].

Для относительной количественной оценки содержания ДНК-кукурузы линии MON 810 с помощью специфической для кукурузы референсной системы амплифицировали фрагмент размером 79 п. о. кукурузного гена *hmg*, используя ген-специфическую комбинацию праймеров и зондов.

D.2.5 Реактивы

D.2.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. ISO 24276 (пункт 6.6).

D.2.5.2 Вода

D.2.5.3 ПЦР-буфер (без $MgCl_2$) 10-кратный

D.2.5.4 Раствор $MgCl_2$, *c* ($MgCl_2$) = 25 ммоль/л

D.2.5.5 Раствор дНТФ, *c* (дНТФ) = 2,5 ммоль/л (каждый)

D.2.5.6 Олигонуклеотиды

Подробная информация о применяемых олигонуклеотидах приведена в таблице D.6.

[85)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица D.6 – Олигонуклеотиды

Наименование	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность эталонного гена		
ZM1-F	5'-TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA-3'	300 нмоль/л
ZM1-R	5'-gCT ACA TAg ggA gCC TTg TCC T-3‘	300 нмоль/л
Зонд ZM1	5'-FAM-CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-TAMRA-3' [a]	160 нмоль/л
Целевая последовательность ГМО		
Mail-F1	5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA CgT-3'	300 нмоль/л
Mail-R1	5'-gCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3'	300 нмоль/л
Зонд Mail-S2	5'-FAM-AAC ATC CTT TgC CAT TgC CCA gC-TAMRA P-3' [a]	180 нмоль/л
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Размер ген-специфического ПЦР-продукта *hmg*-гена составляет 79 п. о.; размер MON 810-специфического ПЦР-продукта составляет 92 п. о.

D.2.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [86)].

D.2.5.8 Урацил-N-гликозилаза (при необходимости)

D.2.5.9 Реакционная смесь амплификации

Подробности реакционной смеси амплификации приведены в таблице D.7.

D.2.6 Аппаратура

D.2.6.1 Общие положения

Должно использоваться стандартное лабораторное оборудование, если не установлено иное.

D.2.6.2 Термоциклер

Указанный температурно-временной профиль изначально был протестирован с прибором СОП ABI PRISM® 7700 и СОП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems) [87)]. Могут использоваться другие системы обнаружения ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

D.2.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере реального времени, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (8 крышек/плоских полосок) (Applied Biosystems) [87)].

D.2.7 Порядок проведения ПЦР

D.2.7.1 Общие положения

ПЦР для таксон-специфической целевой последовательности и для целевой последовательности ГМО должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод описан для ПЦР с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и реактивами, список которых приведен в таблице D.7.

[86)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

[87)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

Таблица D.7 – Окончательный объем реакционной смеси для амплификации (на одну реакционную пробирку)

Общий объем реакционной смеси		25 мкл
ДНК-матрица (2,3-150 нг ДНК-кукурузы)		5 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/л 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер A TaqMan® (содержащий пассивный эталонный ROX) [a]	1X
	$MgCl_2$	6,5 моль/л
Праймеры	См. таблицу D.6	См. таблицу D.6
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/л каждого
Зонды	См. таблицу D.6	См. таблицу D.6
[a] ROX – карбокси-X-родамин.		

D.2.7.2 Контроль ПЦР

В качестве положительного контроля и эталонного калибровочного материала может быть использован СЭМ MON 810 (материал, содержащий от < 0,02 % до 5,0 % ГМ-кукурузы), изготовленный IRMM, Гиль, Бельгия (серии IRMM-413).

Должны быть проведены все виды контроля, установленные в ISO 24276.

D.2.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице D.8, оптимизирована для СОП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) [88)]. В валидационном исследовании она используется в сочетании с ДНК-полимеразой AmpliTaq Gold® [88)]. Использование других термоциклеров может потребовать специфической адаптации. Время для активации/первоначальной денатурации зависит от используемой полимеразы.

Условия реакции приведены в таблице D.8.

Таблица D.8 – Условия проведения реакции

		Время, с	Температура, °С
Процедура перед ПЦР: деконтаминация		120	50
Процедура перед ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация ДНК-матрицы		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Ренатурация и элонгация	60	60

D.2.8 Ограничения и оценка результатов

Приведенный метод пригоден для измерения соотношения уровня MON 810-специфической ДНК к содержанию ДНК-кукурузы. Это соотношение отражает относительное количество MON 810 в кукурузном ингредиенте исследуемого пищевого продукта.

Примечание – Если ДНК-кукуруза была утрачена или сильно деградирована в ходе обработки пищевого продукта при его приготовлении (например, при получении рафинированного масла) или если кукуруза является только очень минорным компонентом анализируемого образца, количество кукурузного стандарта и/или ГМ-специфических копий будет на уровне или ниже предела количественного определения, описанные методы не будут применимыми.

[88)] Приведены примеры доступных коммерческих продуктов. Информация предоставлена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия указанного продукта требованиям ISO. Допускается использование эквивалентных продуктов в случае, если доказано, что будут достигнуты аналогичные результаты.

D.2.9 Калибровка и расчет результатов

После определения порогового значения во время логарифмической фазы амплификации [например, от 0,01 до 0,1 нормализованной флуоресценции репортерного красителя (R_n)] программное обеспечение прибора рассчитывает значения C_t для каждой реакции. Строят график зависимости значений C_t, которые измерены для калибровочных точек, приготовленных из СЭМ, предназначенных для количественных анализов (СЭМ IRMM-413) в ПЦР-системах, специфических для кукурузного таксона и MON 810 соответственно, от натурального логарифма числа копий ДНК. Число копий, измеренное для ДНК неизвестных образцов, получают интерполяцией из стандартных кривых.

Калибровочную кривую получают путем построения графика зависимости значений C_t от логарифма числа копий целевой последовательности для калибровочных точек. Это может быть сделано, например, с помощью программного обеспечения (электронной таблицы), такой как Microsoft Excel [88)], или напрямую с использованием опций, доступных в программном обеспечении СОП.

Для определения количества ДНК MON 810 в исследуемом образце число копий MON 810 делится на число эквивалентов кукурузного генома и умножается на 100, чтобы получить значение в процентах. Для получения значения 1С см. ссылку [14].

В дополнение к прогону количественного анализа следует проводить факультативный, так называемый контрольный прогон. Контрольный прогон должен быть также включен в межлабораторные испытания и должен еще улучшить процедуру анализа. Контрольный прогон наиболее важен при анализе матриксов, для которых мало известны выход и качество ДНК. Тестируя в контрольном прогоне два различных разбавления экстрагированной нуклеиновой кислоты (например, разбавлений раствора ДНК 1 : 10 и 1 : 40), может быть обнаружено возможное присутствие ингибитора (ов) амплификации, а также может быть определено подходящее разбавление экстракта нуклеиновой кислоты, полученной из исследуемого образца, попадающее в калибровочный диапазон количественного анализа.

Библиография

[1] DIVIACCO, S., NORIO, P., ZENTILIN, L., MENZO, S., CLEMENTI, M., BIAMONTI, G., RIVA, S., FALASCHI, A., and GIACCA, M. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene*, 1992, 122 (2), 313 – 320
(Новая процедура количественного определения цепной реакции полимеразы посредством совместной амплификации конкурирующих шаблонов)

[2] PANNETIER, C., DELASSUS, S., DARCHE, S., SAUCIER, C. and KOURILSKY, P. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21 (3), 577 – 583
(Количественная титрация нуклеиновых кислот посредством реакций ферментативной амплификации, достаточной для насыщения)

[3] ORLANDO, C., PINZANI, P. and PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.*,1998, 36 (5), 255 – 269
(Разработки в количественном определении ПЦР)

[4] YANG, B., YOLKEN, R., and VISCIDI, R. Quantitative polymerase chain reaction by monitoring enzymatic activity of DNA polymerase. *Anal. Biochem.*, 1993, 208 (1): 110 – 116
(Количественное определение полимеразной цепной реакции посредством мониторинга ферментативной активности полмеразы ДНК)

[5] THOMPSON, M., and WOOD, R. Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories, *J. Pure App. Chem.*, 1995, 67 (4) 649 – 666
(Гармонизированное Руководство по внутреннему контролю качества в аналитических химических лабораториях)

[6] Alinorm 03/23 *Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes.* Codex Alimentarius Twenty-sixth Session, Rome, Italy, 30 June – 5 July 2003
(Критерии оценки приемлемых методов анализа для целей Кодекса. 26-я сессия Кодекса Алиментариус, Рим, Италия, 30 июня – 5 июля 2003 г.)

[7] gost.e-ecolog.ru

[8] Eurachem Guide: «*The fitness for Purpose of Analytical methods – A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*», Eurachem Working Group, Dec 1998
(Руководство Еврахим «Пригодность для использования аналитических методов. Руководство для лабораторий в отношении метода валидации и связанных с ней тем», рабочая группа Eurachem, декабрь 1998 г.)

[9] Eurachem/CITAG Guide: *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Ellisson, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., 2000, 2nd Ed.
(Руководство Еврахим/Ситак «Погрешность количественного определения при аналитическом измерении»)

[10] *IRMM Certified Reference Material Reports and Certificates.*
gost.e-ecolog.ru
(Отчеты по сертифицированным эталонным материалам IRMM и сертификаты)

[11] HERNANDEZ, M., DUPLAN, M.-N., BERTHIER, G., VAÏTILINGOM, M., HAUSER, W., FREYER, R., PLA, M. and BERTHEAU, Y. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 2004, 52: 4632 – 4637
(Разработка и сравнение четырех систем полимеразной цепной реакции в реальном времени для конкретного обнаружения и количественного определения Zea mays L. Химический Журнал в области сельского хозяйства и пищевых продуктов)

[12] HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Appl. Chem*, 1995, 67: 331 – 343
(Протокол по разработке, ведению и интерпретации метода изучения характеристик)

[13] DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep*. Vol. 1, 1983, 4: 19 – 2156
(Миниподготовка растительного ДНК: версия II)

[14] ARUMUGUNATHAN, K., EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep*. 1991, 9: 208 – 218
(Ядерное содержимое ДНК некоторых важных растительных видов)

[15] Community Reference Laboratory (2004a). *GMO specific real-time PCR system*. Protocol for eventspecific quantitation of Bt11 in maize. Protocol published by the European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. gost.e-ecolog.ru . 6 pp.
(Сообщество метрологических лабораторий (2004a). Система ПЦР, специфическая для ГМО в реальном времени. Протокол обнаружения специфического события в кукурузе Bt11 путем количественной ПЦР. Протокол опубликован Европейской комиссией, Исследовательским центром совместно с Организацией здравоохранения и защиты потребителей)

[16] Community Reference Laboratory (2004b). *Validation of the GMO specific detection method developed by NVI/INRA for Bt11 in sweet maize*. Report published by the European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. gost.e-ecolog.ru %20Sweet%20maize%20validation%20report.pdf. 9 pp.
(Сообщество метрологических лабораторий (2004b). Проверка достоверности метода обнаружения ГМО, разработанного NVI/INRA для Bt11 в сладкой кукурузе. Протокол опубликован Европейской комиссией, Исследовательским центром совместно с Организацией здравоохранения и защиты потребителей)

[17] JAENICKE-DESPRÉS, V., BUCKLER, E.S., SMITH, B.D., GILBERT, M.T.P., COOPER, A., DOEBLEY, J. and PÄÄBO, S. Early Allelic Selection in Maize as Revealed by Ancient DNA. *Science,* 2003, 302: 1206 – 1208
(Ранняя аллельная селекция в кукурузе, выявленная древняя ДНК)

[18] PAUWELS, J., KRAMER, G.N., SCHIMMEL, H., ANKLAM, E., LIPP, M. BRODMANN, P. *The Certification of Reference Materials of Soya bean Powder with different Mass Fractions of RoundupReady® Soya bean*, EC certification report EUR 18683 EN, 1999, ISBN 92-828-5925-8
(Сертификация эталонных материалов порошка бобов сои с различными концентрациями сои RoundupReady® . Протокол сертификации Европейской комиссии EUR)

[19] PAULI, U., LINIGER, M., SCHROTT, M., SCHOUWEY, B., HÜBNER, Ph., BRODMANN, P., and EUGSTER, A Quantitative Detection of Genetically Modified Soybean and Maize: Method Evaluation in a Swiss Ring Trial. *Mitt. Lebens. und Hyg*. 2001, 92: 145–158
(Количественное определение генетически модифицированной сои и кукурузы. Метод оценки в круговых сличениях в Швейцарии)

[20] HÜBNER, Ph., WAIBLINGER, H-U., PIETSCH, K., and BRODMANN, P. Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food. *J. AOAC Int*, 2001, 84: 1855 – 1864
(Проверка достоверности методов ПЦР количественного определения генетически модифицированных растений в пищевых продуктах)

[21] VODKIN, L.O., RHODES, P.R., GOLDBERG, R.B. Ca Lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*,1983, 34: 1023 – 1031
(Включенный ген лектина Са имеет структурные признаки мобильного генетического элемента)

[22] PADGETTE, S.R., KOLACZ, K.H., DELANNY, X., RE, D.B., LAVELLEE, B.J., TINIUS, C.N., RHODES, W.K., OTERO, Y.I., BARY, G.F., EICHHOLTZ, D.A., PESCHKE, V.M., NIDA, D.L., TAYLOR, N.B., KISHORE, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 1995, 35: 1451 – 1461
(Разработка, идентификация и характеристика соевой линии, толерантной к глифосату)

[23] SLMB-Methode 52B/2.1.3/2000 (CD-Rom, Eidgenössische Materialzentrale, PO Box, CH 3000, Bern)
(Метод SLMB 52B/2.1.3/2000)

[24] GRUBBS, F.E. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 1969, 11: 1 – 21
(Процедуры обнаружения отдаленных наблюдений в образцах)

[25] HEMMER, W. *Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods*. In: BATSreport (Agency for Biosafety research and assessment of technology Impacts of the Swiss priority, Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland), 1997, 2, 97
(Пищевые продукты, полученные из генетически модифицированных организмов и методы обнаружения. Доклад BATS (Агентство по исследованию биологической безопасности и оценке технологических воздействий Швейцарской приоритетной Программы по биотехнологии Швейцарского национального научного фонда, Базель, Швейцария)

[26] BRUNT, A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M., GIBBS, A., WATSON, L. *Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. 1996, 1484 pp. C.A.B. International, U.K.
(Вирусы растений. Описания и перечни из базы данных VIDE)

[27] QIU, S.G., WINTERMANTEL, W.M., SHA, Y., and SCHOELZ, J.E. Light-Dependent Systemic Infection of Solanaceous Species by Cauliflower Mosaic Virus Can Be Conditioned by a Viral Gene Encoding an Aphid Transmission Factor. *Virology*, 1997, 227, pp 180 – 188
(Зависимая от света систематическая инфекция пасленовых видов мозаичным вирусом цветной капусты может быть кондиционирована вирусным генным кодированием фактора передачи или растительной)

[28] WOLF, C., SCHERZINGER, M., WURZ, A., PAULI, U., HÜBNER, Ph. and LÜTHY, J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35Spromoter screening results. *Eur Food Res Technol*. 2000, 210: 367 – 372
(Обнаружение мозаичного вируса цветной капусты путем полимеразной цепной реакции: тестирование пищевых компонентов на ложнопозитивные результаты скрининга промотра 35S)

[29] TRAPMANN, S., LE GUERN, L., KRAMER, G.N., SCHIMMEL, H., PAUWELS, J., ANKLAM, E., VAN DEN EEDE, E., BRODMANN, P. *The Certification of a new set of Reference Materials of Soya bean Powder with different Mass Fractions of Roundup ReadyTM Soya bean*, 2000. EC certification report EUR 19573 EN, ISBN 92-828-9639-0
(Сертификация нового набора эталонных материалов порошка сои различной концентрации Roundup ReadyTM.)

[30] LEE, L.G., CONNELL, C.R., and BLOCH W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21 (16), 3761 – 6
(Аллельное различение ПЦР с флуорогенными зондами)

[31] HUPFER, C., HOTZEL, H., SACHSE, K., ENGEL, K.-H. Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Lm. Unters. Forsch.*, 206 (Band A), 1998, pp. 203 – 207
(Обнаружение генетической модификации в обработанных нагревом продуктах кукурузы Bt с помощью полимеразной цепной реакции)

[32] PAUWELS, J., KRAMER, G.N., SCHIMMEL, H., ANKLAM, E., LIPP, M., BRODMANN, P. *The Certification of Reference Materials of Maize Powder with different Mass Fractions of BT-176 Maize*, EC certification report EUR 18684 EN, ISBN 92-828-5924
(Сертификация эталонных материалов кукурузного порошка различной концентрации кукурузы BT-176. Протокол по сертификации ЕК EUR 18684 EN)

[33] KURIBARA, H., SHINDO, Y., MATSUOKA, T., TAKUBO, K., FUTO, S., AOKI, M., HIRAO, T., AKIYAMA, H., GODA, Y., TOYODA, M. and HINO, A. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. *J.AOAC Int.* 2002, 85, 1077 – 1089
(Новые эталонные молекулы для количественного определения генетически модифицированных сои и кукурузы)

[34] SHINDO, Y., KURIBARA, H., MATSUOKA, T., FUTO, S., SAWADA, C., SHONO, J., AKIYAMA, H., GODA, Y., TOYODA, M. and HINO, A. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. *J.AOAC Int.* 2002, 85, 1119 – 1126
(Проверка достоверности анализов ПЦР специфического для линии количественного определения в реальном времени генетически модифицированной кукурузы и сои с использованием новых эталонных молекул)

[35] *Instruction Manual for Testing and Analysing Genetically Modified Food – Quantitative PCR*, Japanese Agricultural Standard Testing and Analysis Handbook Series (Centre for Food Quality, Labelling and Consumers Services, Saitama, Japan). 2002
(Инструкция по тестированию и анализированию генетически модифицированных пищевых продуктов. Количественная ПЦР)

[36] *Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques*, Ministry of Health, Labor and Welfare(Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan), 2002
(Тестирование пищевых продуктов, произведенных с применением методик рекомбинантных ДНК, Министерство здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии)

[37] *Guideline of Detection Methods of Genetically Modified Foods*, Korean Food and Drug Administration, Korea
(Руководство по обнаружению методов генетически модифицированных продуктов, Управление пищевыми продуктами и лекарственными препаратами Кореи)

[38] *Testing Manual for Genetically Modified Agricultural Products* by National Agricultural Quality Services, Korea
(Руководство по тестированию генетически модифицированных пищевых продуктов Национальной службой качества сельскохозяйственной продукции)

[39] *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL,* 17th Ed., 2000, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Appendix D, pp 2–11
(Официальные методы анализа AOAC)

[40] COCHRAN, W.G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics,* 1949, 11: 47 – 52
(Распределение большей части наборов оцененных дисперсий как части их целого)

[41] GRUBBS, F.E. Sample criteria for testing outlying observations.. *Ann. Math. Statist. Assn.* 1950, 21: 27 – 58
(Критерии образца для тестирования наблюдений резко выделяющихся значений)

[42] KOPPEL, E., STADLER, M., LUTHY, J., HUBNER, P. Sensitive method for the Detection of the Genetically Engineered Soy Bean "Roundup Ready®, *Mitt. Gebiete. Hyg*. 1997, 88: 164 – 175
(Чувствительный метод обнаружения генетически иодифицированной сои "Roundup Ready®)

[43] anonymous. *Relative quantitation of Gene Expression*. User Bulletin ABI Prism 7700 Sequence Detection System, 1997, 2: 1 – 36
(Без автора. Сравнительное количественное определение экспрессии генов)

[44] Eurachem Guide: «*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*», Ellisson, L.R., Rosslein, M., Williams, A., 2000
(Руководство Еврахим «Определение погрешности при аналитическом измерении»)

[45] Eurachem/CITAG Guide: *Traceability in Chemical Measurement*, Ellisson, L.R., King, B., Rosslein, M., Salit, M., Williams, A., 2003
(Руководство Еврахим/Ситак «Прослеживаемость в химическом измерении»)

[46] MATSUOKA, T., KURIBARA, H., TAKUBO, K., AKIYAMA, H., MIURA, H., GODA, Y., KUSAKABE, Y., ISSHIKI, K., TOYODA, M., & HINO, A. Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically modified Maize (Zea mays). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2100 – 2109
(Обнаружение сегментов рекомбинантной ДНК, введенной в генетически модифицированную кукурузу)

[47] RØNNING, S.B., VAÏTILINGOM, M., BERDAL, K.G. & HOLST-JENSEN, A. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11maze (*Zea mays*). *European Food Res. Technol.* 2003, 216: 347 – 354
(Количественное определение специфического события в генетически модифицированной кукурузе Bt11 путем количественной ПЦР)

[48] KRECH, A.B., WURZ, A, STEMMER, C., FEIX, G., GRASSER, K.D. Structure of genes encoding chromosomal HMG1proteins from maize. *Gene,* 1999, 234: 45 – 50
(Структура генов, включающих хромосомные протеины HMG1 из кукурузы)

[49] Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM): Certified Reference Materials ERM-XY000xy. CERTIFICATION REPORT. The certification of dry-mixed maize powder with different mass fractions of MON 810 maize Certified Reference Materials ERM BF413a, BF413b, BF413c, BF413d, BF413e, BF413f. gost.e-ecolog.ru , 2004
(Институт эталонных материалов и измерений. Сертифицированные эталонные материалы HMG1. Протокол сертификации. Сертификация сухого порошка кукурузы с различной концентрацией кукурузы MON 810, сертифицированные материалы)

[50] HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D. and GELFAND D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88 (16), 7276 – 80
(Обнаружение специфической полимеразной цепной реакции продукта путем применения 5'-3' экзонуклеазной активности полимеразной ДНК Thermus aquaticus)

[51] ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

[52] ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)

[53] ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные критерии погрешности стандартного метода измерения)

[54] ISO 5725-4:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основной метод определения правильности стандартного метода измерения)

[55] ISO 5725-5:1998 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 5. Альтернативные методы определения сходимости стандартного метода измерения)

[56] ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике)

[57] HINO, A., MATSUOKA, T., KURIBARA, H. FUTO, S., OGAWA, M., YOSHIMURA, T., SHINDO, Y. 2000, WO02/34943 A1 (patent pending)
(Заявка на патент WO02/34943 A1)

[58] GELFAND, D.H., HOLLAND, P.M., SAIKI, R.K, and WATSON, R.M. 1993, US Patent 5,210,015
(Патент США 5,210,015)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 21569:2005 Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Качественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте	IDT	ГОСТ ИСО 21569-2009 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы качественного обнаружения на основе анализа нуклеиновых кислот
ISO 21571:2005 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Извлечение нуклеиновой кислоты	IDT	ГОСТ ИСО 21571-2009 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Экстрагирование нуклеиновых кислот

УДК [664:604.6]:543.61.062(083.74)(476) МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукты пищевые, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), генетически модифицированные организмы (ГМО), полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 07.10.2010. Подписано в печать 28.10.2010. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 11,97 Уч.- изд. л. 7,10 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru