ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ИСО 21569-2009

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы качественного обнаружения на основе анализа нуклеиновых кислот

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ

Метады аналізу для выяўлення генетычна мадыфікаваных арганізмаў і вытворных прадуктаў. Метады якаснага выяўлення на аснове аналізу нуклеінавых кіслот

(ISO 21569:2005, 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 республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) 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
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21569:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods (Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы качественного обнаружения на основе анализа нуклеиновых кислот).

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 Национальном фонде ТНПА.

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

Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь 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 воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Содержание

Введение V
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Принцип метода 2
5 Реактивы 2
6 Инструменты и оборудование 3
7 Процедура анализа 3
8 Интерпретация результатов 5
9 Предоставление результатов и контроль качества 6
10 Протокол испытаний 6
Приложение А (справочное) Методы, специфичные к целевым таксонам 7
Приложение В (справочное) Методы скрининга 20
Приложение С (справочное) Методы, специфичные к генетической конструкции 33
Приложение D (справочное) Методы, специфичные к трансформационным событиям 51
Библиография 55
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту 60

Введение

Обнаружение генетически модифицированных источников в ингредиентах пищевых продуктов выполняется посредством описанных далее действий, выполняемых последовательно или одновременно. После отбора пробы из анализируемой порции проводят выделение нуклеиновых кислот. Выделенные нуклеиновые кислоты могут быть дополнительно очищены, одновременно с процессом выделения или после него. Дальнейшими действиями являются определение их концентрации (при необходимости), разведение (при необходимости) и использование в аналитических процедурах (например, в анализе ПЦР). Проведение этих действий подробно описано в настоящем стандарте, а также в группе международных стандартов, объединенных общим заголовком: «Пищевые продукты. Методы анализа для определения генетически модифицированных организмов и содержащих их продуктов»:

– «Отбор проб» (ISO 21568);

– «Методы количественного определения на основе анализа нуклеиновых кислот» (ISO 21570);

– «Выделение нуклеиновых кислот» (ISO 21571).

Дополнительная информация об общих требованиях и определениях, включая описанные выше шаги, приводится в международном стандарте ISO 24276.

Качественное определение целевых последовательностей ДНК выполняется с целью получения ответа «да» или «нет» на вопрос о содержании или отсутствии целевой последовательности ДНК с учетом соответствующих контрольных проб в пределах обнаружения используемого метода анализа и для анализируемой части образца.

Специфичность методов, в соответствии с описаниями в приложениях A – D, варьируется от скрининга (определение типичных последовательностей ДНК, характерных для ГМО) до специфической идентификации генетической конструкции или специфического события генетической трансформации.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов.
Методы качественного обнаружения на основе анализа нуклеиновых кислот

ПРАДУКТЫ ХАРЧОВЫЯ
Метады аналізу для выяўлення генетычна мадыфікаваных арганізмаў і вытворных прадуктаў.
Метады якаснага выяўлення на аснове аналізу нуклеінавых кіслот

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

Дата введения 2011-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт содержит описание процедур качественного определения генетически модифицированных организмов (ГМО) и содержащих их продуктов путем анализа нуклеиновых кислот, выделяемых из исследуемого образца. Основное внимание уделено методам анализа на основе амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В настоящем стандарте приводятся общие требования к специфическому определению и идентификации целевых последовательностей нуклеиновой кислоты (ДНК) и к подтверждению идентичности амплифицированной последовательности ДНК.

Руководства, минимальные требования и критерии выполнения, установленные в настоящем стандарте, предназначены для обеспечения получения сопоставимых, точных и воспроизводимых результатов в различных лабораториях.

Настоящий стандарт был разработан для матриц пищевых продуктов, однако может быть также применен для анализа других матриц (например, корма для животных, образцы растений из окружающей среды).

Примеры конкретных методов приводятся в приложениях A – D.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа.

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

ISO 24276:2006 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения

3 Термины и определения

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

Издание официальное

4 Принцип метода

4.1 Общие положения

Качественный анализ представляет собой специфическое определение целевых последовательностей нуклеиновой кислоты в анализируемых образцах. Каждый метод должен быть специфичен для целевой последовательности.

Результат качественного анализа должен четко показывать наличие или отсутствие исследуемого генетического элемента с учетом соответствующих контролей в пределах обнаружения используемого метода анализа и для анализируемой части образца.

4.2 ПЦР-амплификация

Амплификация целевой последовательности ДНК производится *in vitro* посредством реакции, катализируемой ДНК-полимеразой, в присутствии олигонуклеотидов-праймеров и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в заданном реакционном буфере [1], [2]. Необходимым условием для проведения амплификации целевой последовательности является отсутствие ингибиторов полимеразы в реакционной смеси. Амплификация ДНК – это циклический процесс, состоящий из следующих этапов:

– денатурация двухнитевой ДНК в однонитевую нуклеиновую кислоту посредством нагрева;

– отжиг (специфическая гибридизация) праймеров к целевой последовательности при соответствующей температуре и

– элонгация праймеров, связанных с обеими одинарными спиралями, ДНК-полимеразой, применимой в ПЦР, при соответствующей температуре.

4.3 Обнаружение и подтверждение продуктов ПЦР

Обнаружение продуктов ПЦР производится с помощью электрофореза в агарозном геле или при необходимости альтернативными доступными методами после изоляции посредством соответствующей процедуры разделения.

Идентификация любой обнаруженной целевой последовательности может быть подтверждена соответствующей методикой (например, с помощью рестрикционного анализа ферментами рестрикции, гибридизации или анализа последовательности ДНК).

В случае использования анализа ПЦР в реальном времени амплификация и детектирование происходят одновременно.

5 Реактивы

Если это не оговаривается особо, растворы реактивов, используемых для анализа, обычно хранят приблизительно при минус 20 °С.

Целесообразно разделить используемые для аналитического метода растворы реактивов на малые порции, это позволит избежать многократного повторения циклов размораживания/замораживания, а также снизить риск перекрестной контаминации.

5.1 Целевая ДНК/Контроль

5.2 Вода

5.3 Раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP), содержащий dATP, dCTP, dGTP и dTTP или dUTP.

Примечание – Использование dUTP может отрицательно повлиять на дальнейшее проведение анализа продуктов амплификации ПЦР с помощью рестрикционного анализа.

5.4 Буферный раствор для ПЦР

Буферный раствор для ПЦР обычно поставляется с ДНК-полимеразой. Этот раствор может содержать или не содержать $MgCl_2$ в концентрации, указанной производителем. Конечная концентрация $MgCl_2$ индивидуальна для каждого метода и, следовательно, приводится в каждом приложении. На рынке также могут быть представлены готовые к использованию реактивы. Для таких реактивов следует соблюдать инструкцию, предоставляемую производителем.

5.5 Термостабильная ДНК-полимераза

5.6 Прямой праймер

5.7 Обратный праймер

6 Инструменты и оборудование

Подробная информация по инструментам и оборудованию приводится в ISO 24276 и приложениях A – D.

7 Процедура анализа

7.1 Качество, целостность и амплифицируемость выделенной нуклеиновой кислоты

Раствор нуклеиновой кислоты должен быть достаточно чистым для последующего анализа [3]. Качество и количество выделенной с помощью заданного метода из определенного материала образца нуклеиновой кислоты должны быть повторяемы и воспроизводимы.

Примечание – Качество, целостность и количество образца ДНК влияет на выход ПЦР и, следовательно, на получаемые результаты анализа. Предел обнаружения конкретного метода может, таким образом, зависеть от того, был ли анализируемый материал обработан или очищен, а также от степени деградации (разрушения) ДНК в нем.

Нуклеиновые кислоты, используемые в ПЦР, не должны содержать ингибиторы ПЦР [4]. Необходимо использовать контроли ингибирования ПЦР, описанные в ISO 24276.

7.2 Критерии выполнения анализа

Общие критерии выполнения анализа описаны в ISO 24276.

Значения характеристик выполнения анализа приводятся для каждого метода и указаны в приложениях A – D; при этом следует учитывать размер генома, см. [5].

Для каждой пары праймеров и/или системы следует оптимизировать условия реакции, особенно концентрацию $MgCl_2$ и программу работы амплификатора. При использовании какой-либо системы праймеров в первый раз необходимо предварительно доказать, что условия цикла, выбранные для конкретного изучаемого материала образца, позволяют избежать образования нежелательных конкурирующих продуктов реакции, которые в противном случае снизят чувствительность обнаружения в ПЦР.

В оптимальной реакции требуется менее 40 циклов для амплификации 10 и более целевых молекул и получения продукта, который может быть легко обнаружен стандартными методами. По мере увеличения числа циклов возможно накопление неспецифических продуктов реакции. Оптимизированная ПЦР должна позволять получить за 40 циклов из чистого образца стандартного состава, в котором содержатся 100 копий матрицы ДНК, достаточное для обнаружения количество копий продукта ПЦР. Следует строго придерживаться заданных количества циклов, профиля кривой «температура – время» для каждой системы праймеров и реакционной смеси, учитывая используемое оборудование.

В целом следует максимально возможно увеличивать специфичность реакции (например, используя ПЦР с «горячим стартом»). ПЦР с «горячим стартом» рекомендуется как средство снижения побочных реакций (например, амплификация нецелевых последовательностей фоновой ДНК (ошибочная посадка праймеров) или олигомеризация праймеров) и, таким образом, увеличения специфичности метода.

Значения, полученные в ходе метрологической аттестации, могут быть не применимы к диапазонам концентраций анализируемого вещества и материалам образцов, отличающихся от перечисленных в соответствующих приложениях.

7.3 Аспекты подбора параметров ПЦР

7.3.1 Общие положения

Так как выполнение каждой индивидуальной ПЦР должно быть сопоставимо с другими специфическими ПЦР, следует учитывать приведенные далее аспекты подбора параметров ПЦР.

7.3.2 Размер ПЦР-продуктов

Размер целевой последовательности следует выбирать таким образом, чтобы он попадал в диапазон молекулярных масс, имеющихся в выделенной из анализируемого образца ДНК.

Пример – Для сильно деградировавшей ДНК из продуктов, прошедших термическую обработку, оптимальный размер ПЦР-продукта должен быть в диапазоне от 60 до 150 пар нуклеотидов (п. н.). Для сырья можно использовать более широкий диапазон, например вполне допустимо значение 250 п. н.

Однако, если в результате предварительно проведенных экспериментальных исследований по оценке соответствия наборов праймеров получены ПЦР-продукты различного размера, эти праймеры могут быть использованы для анализа образцов, материал которых был аттестован в таких исследованиях.

7.3.3 Праймеры

7.3.3.1 Общие положения

Информация о последовательности праймеров приводится в приложениях A – D.

7.3.3.2 Подбор праймеров

Последовательности праймеров должны по возможности иметь следующие характеристики:

– длина каждого праймера – от 18 до 30 нуклеотидов;

– оптимальная температура отжига – ≈ 60 °С (должна быть установлена экспериментальным путем), т. е. расчетная температура плавления должна быть ≤ 65 °С;

– по возможности соотношение GC : AT = 50 : 50 или как можно ближе к этому соотношению;

– высокая внутренняя стабильность (не допускается концентрация нуклеотидов G и C в коротких сегментах праймеров);

– минимальная 3'-концевая комплементарность для предотвращения образования димеров праймеров;

– минимальная вторичная структура;

– минимальное образование димеров со специфическими зондами для детектирования, разработанными для ПЦР.

Для облегчения подбора праймеров разработаны специализированные программы.

7.3.3.3 Метрологическая аттестация праймеров

7.3.3.3.1 Общие положения

Следует подтвердить способность праймеров обнаруживать целевую последовательность.

Аттестацию праймеров следует проводить в два этапа: первый этап заключается в теоретической оценке, а второй – в экспериментальных испытаниях.

7.3.3.3.2 Теоретическая оценка специфичности

Теоретическая оценка специфичности праймеров должна как минимум включать в себя проверку схожести последовательностей (например, с помощью программ FastA, Blast® [2]) с одной из крупных баз данных последовательностей нуклеиновых кислот (например, EMBL, GenBank® [2]). Последовательности гомологичных генов могут быть получены из баз данных последовательностей и проверены на гомологичность для получения оценки шанса обнаружения схожих с целевым таксоном последовательностей или последовательностей других организмов.

7.3.3.3.3 Экспериментальная оценка специфичности

Вне зависимости от использованных критериев подбора праймеров их специфичность обязательно должна быть установлена экспериментальным путем. Такая оценка должна подтвердить способность праймеров различать целевую и нецелевую, но схожую последовательности.

Следует подтвердить, что праймеры, подобранные для обнаружения целевых последовательностей, специфичных к таксону, способны достоверно обнаруживать эти последовательности в достоверном количестве различных членов таксона.

7.4 Описание целей ПЦР

Для качественного обнаружения и идентификации ГМО можно провести различные ПЦР-исследования, зависящие от типа материалов исследуемых образцов и/или от требований к анализу. Эти исследования могут быть направлены на последовательности, специфичные для целевых таксонов, генетических конструкций и трансформационных событий, а также для элементов, пригодных для задач скрининга.

---

[2] Blast и GenBank – это примеры представленных на рынке программных продуктов, которые могут быть использованы для оценки специфичности. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных программ, если они позволяют получать такие же результаты.

7.5 Контроли

Из-за существования риска получения ложноположительных и/или ложноотрицательных результатов в каждое исследование ПЦР следует включить соответствующие контроли (см. ISO 24276).

При условии наличия на рынке соответствующих сертифицированных образцов стандартного состава (референсные образцы стандартного состава) их следует использовать в качестве положительных и отрицательных контрольных проб.

7.6 Проведение ПЦР, обнаружение и подтверждение продуктов ПЦР

В приложениях A – D приводится подробное описание конкретных этапов последовательности ПЦР-анализа.

Примечание – Если для обнаружения продуктов ПЦР используется электрофорез в агарозном геле, размер продуктов ПЦР может быть оценен с помощью соответствующих маркеров длины ДНК, которые следует запустить параллельно с исследуемыми ПЦР-продуктами.

В некоторых случаях желательно подтвердить положительный или отрицательный результат для определенной генетической модификации. Такое подтверждение может быть проведено с помощью применения праймеров к альтернативной целевой последовательности; этот способ бывает особенно полезен при подтверждении результатов скрининга.

Положительная идентификация специфической последовательности целевой ДНК может быть подтверждена соответствующим методом (но не определением размера ПЦР-продукта), например:

– путем гибридизации ПЦР-продукта со специфичными зондами, или

– путем проведения рестрикционного анализа ПЦР-продуктов; длина полученных фрагментов должна соответствовать ожидаемой длине целевой последовательности ДНК после рестрикции, или

– путем секвенирования (определения последовательности) ПЦР-продукта, или

– другим эквивалентным методом подтверждения.

Если используемые праймеры подобраны для обнаружения последовательностей, полученных из инфекционных организмов (встречающиеся в природе генетически немодифицированные организмы, например вирусы или бактерии), рекомендуется убедиться в том, что обнаруженная ДНК действительно происходит из ГМО. Такое подтверждение может быть выполнено путем проверки отсутствия другой ДНК, произошедшей из инфекционного организма.

Пример – 35S-промотор, полученный из вируса мозаики цветной капусты (CaMV); соответственно, обнаружение этого промотора может быть обусловлено наличием ДНК, произошедшей из ГМО или из CaMV [6]. Проверив наличие другой ДНК из вируса мозаики цветной капусты, можно удостовериться в происхождении 35S-промотора и последовательности ГМО (если не обнаружена другая последовательность ДНК из CaMV).

8 Интерпретация результатов

8.1 Общие положения

Результат ПЦР может быть:

a) положительным, если обнаружен специфический ПЦР-продукт, а все контрольные пробы дают результаты в соответствии с ISO 24276, таблица 2, или

b) отрицательным, если не обнаружен специфический ПЦР-продукт, а все контрольные пробы дают результаты в соответствии с ISO 24276, таблица 2.

Примечание – Специфичные для трансформационных событий целевые последовательности иногда обнаруживаются вместе с другими специфичными последовательностями трансформационных событий в одном ГМО (например, из-за наложения генов [7]).

Если получен неопределенный (позволяющий проводить двоякую интерпретацию) результат, анализ следует повторить, см. ISO 24276.

8.2 Подтверждение

Подтверждение положительных или отрицательных результатов может быть выполнено в соответствии с 7.6.

9 Представление результатов и контроль качества

9.1 Общие положения

Результаты должны быть представлены определенно, т. е. не в виде «±».

Отрицательный результат никогда не следует предоставлять в виде «ГМО отсутствует».

В идеале в протоколе должен быть указан предел обнаружения, определенный по соответствующему исследуемому образцу. Однако это требует определенных материалов, ДНК исключительно высокого качества и/или использования сложного лабораторного оборудования, которое имеется не у всех лабораторий. Такой анализ может стать очень трудоемким и/или дорогостоящим, а следовательно, не может быть применен в обычных лабораторных условиях.

В протоколе следует указать по крайней мере предел обнаружения, определенный для образца стандартного состава, и относительное значение для конкретного материала образца (предпочтительно заданное количество раствора геномной ДНК, например 100 нг 0,01 % ДНК GTS 40-3-2).

9.2 Представление отрицательного результата

В протоколе испытаний должен присутствовать следующий текст:

«Целевая последовательность Y не обнаружена в образце X.

Предел обнаружения метода *x* % определен по ABC (укажите референсный образец стандартного состава)».

Если невозможно доказать, что количество целевой ДНК, использованное в ПЦР, было достаточным для применения предела обнаружения, в протокол следует добавить следующее предложение:

«Однако количество целевой ДНК, выделенной из образца X, может быть/было недостаточным для применения предела обнаружения в этом образце».

Примечание – Предел обнаружения в образце определяется по количеству ДНК вида, использованному в аналитической реакции (число копий), и соотношению к абсолютному пределу обнаружения целевой генетической модификации (число копий) [7].

9.3 Представление положительного результата

В протоколе испытаний должен присутствовать следующий текст:

«В образце X обнаружена целевая последовательность Y».

Можно также указать ГМО, если доступна такая информация.

9.4 Требования к контролю качества

Результаты из обеих анализируемых частей образца должны соответствовать друг другу. Если для одной анализируемой части получен отрицательный результат, а для другой – положительный, то анализ следует повторить (см. ISO 24276), по возможности увеличив количество матрицы нуклеиновой кислоты в реакции, так, чтобы получить соответствующие друг другу результаты для обеих частей. Более того, следует как минимум проверить чистоту матрицы ДНК, включив в анализ контроль ингибирования ПЦР. Возможно, будет полезным использование других контрольных методов, например контроль длины и целостности матрицы нуклеиновой кислоты.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен быть оформлен в соответствии с требованиями ISO 24276 и должен содержать по крайней мере следующую дополнительную информацию:

– предел обнаружения и материал образца, использованный для определения предела обнаружения;

– описание специфичности аналитического метода;

– результат, представленный в соответствии с требованиями раздела 9.

Приложение А
(справочное)

Методы, специфичные к целевым таксонам

А.1 Метод, специфичный к целевому таксону, для определения компонентов, полученных из соевых бобов

А.1.1 Общие положения

Описана стандартная процедура определения видоспецифичного однокопийного гена, встречающегося в соевых бобах (*Glycine max*).

Этот метод используется для оценки амплифицируемости ДНК-продуктов, в состав которых входят соевые бобы.

А.1.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

А.1.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместных сличительных испытаниях [8], [9], организованных рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV) в соответствии со статьей 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице А.1.

Таблица А.1 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1997 [8]	1998/1999 [9]
Количество лабораторий	25	27
Количество лабораторий, представивших результаты	22	20
Количество образцов на лабораторию	10	3
Количество принятых результатов	220	60
Количество образцов, содержащих соевые бобы	220	50
Ложноположительные результаты	0	1 (2 %)
Ложноотрицательные результаты	0	1 (2 %)

А.1.2.2 Молекулярная специфичность

А.1.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности, описанной в базе данных GenBank® [3], доступ № K00821 = M30884.

А.1.2.2.2 Теоретическая часть

В качестве целевой последовательности из баз данных генов был выбран ген соевого лектина Le1 [10].

Поиск по базам данных (NCBI BlastN® [3], European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не обнаружил сходства последовательностей ДНК с другими сельскохозяйственными растениями. Однако GM03 дал 100%-ное совпадение последовательностей со следующими

---

[3] GenBank и BlastN – это примеры представленных на рынке программных продуктов, которые могут быть использованы для оценки специфичности. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных программ, если они позволяют получать такие же результаты.

пунктами баз данных: AX033509 (последовательность 17 из патента DE19906169), AX033507 (последовательность 15 из патента DE19906169) и AX033501 (последовательность 9 из патента DE19906169), в то время как GM04 совпадало только с доступом № AX033509 (последовательность 17 из патента DE19906169). Обратите внимание на то, что доступ № M30884 – это то же самое, что и доступ K00821, – элемент базы данных GenBank®, первоначально внесенный в базу в 1993 году.

Количество копий целевой последовательности не определяли, однако предполагалось, что это однокопийный ген.

А.1.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из других сельскохозяйственных растений (бобовых, зерновых и овощных культур), а также из говядины и свинины, не наблюдали амплификацию. Метод ПЦР для соевых бобов показал свою высокую специфичность к ДНК соевых бобов [10], [11].

А.1.2.3 Предел обнаружения

Не был определен абсолютный предел обнаружения, однако с помощью флуорометрического анализа было показано, что метод способен обнаруживать по меньшей мере 0,1 нг ДНК соевых бобов.

А.1.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

А.1.4 Принцип

Принцип метода заключается в амплификации фрагмента ДНК из соевых бобов длиной 118 п. н. с использованием ПЦР и разделении с помощью электрофореза в агарозном геле.

А.1.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

А.1.5.1 Вода

А.1.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 × [4].

А.1.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

А.1.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

А.1.5.5 Олигонуклеотиды

А.1.5.5.1 Прямой праймер

Ген лектина соевых бобов (позиция базы данных GenBank® № K00821).

Праймер GM03: 5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'.

А.1.5.5.2 Обратный праймер

Ген лектина соевых бобов (позиция базы данных GenBank® № K00821).

Праймер GM04: 5'-gCC CAT CTg CAA gCC TTT TTg Tg-3'.

А.1.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

А.1.5.7 Зонд для гибридизации (GM)

5'-ggT AgC gTT gCC AgC TTC g-3'.

А.1.5.8 Солевой буферный раствор с цитратом натрия (SSC) 5 ×, pH 7,0

Пятикратный буферный раствор SSC – это раствор, содержащий 0,75 моль/л NaCl и 0,075 моль/л цитрата натрия.

А.1.5.9 Прегибридизационный раствор

Содержит 5 × SSC, 0,1 % (по массе) N-лаурилсаркозина, 0,02 % (по массе) додецил сульфата натрия (SDS) и 1 % блокирующего реактива Blocking Reagent [5] или 5 % (по массе) обезжиренного сухого молока [12].

---

[4] 10 × означает десятикратный, т. е. буфер для ПЦР, содержащий 1,5 моль/л Трис-HCl, pH 8,3.

[5] Blocking Reagent – это пример коммерчески доступного продукта, производимого компанией Boehringer, Mannheim. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

А.1.5.10 Раствор для гибридизации

Содержит 10 пмоль зонда для гибридизации в 2,5 мл прегибридизационного раствора (А.1.5.9). Температура гибридизации – 50 °С. Дополнительная информация по условиям гибридизации приводится в ссылке [12].

А.1.6 Оборудование

А.1.6.1 Амплификатор

А.1.6.2 Камера для электрофореза, с источником питания.

А.1.7 Процедура анализа

А.1.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице А.2. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице А.2.

Таблица А.2 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	1
Вода		15,9
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,8 ммоль/л	2
Праймер GM03, 5 мкмоль/л	0,2 мкмоль/л	1
Праймер GM04, 5 мкмоль/л	0,2 мкмоль/л	1
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,5 IU	0,1
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

А.1.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава GTS 40-3-2, производимые Институтом референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-410).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

А.1.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице А.3, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или Gene Amp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [6]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

[6] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Таблица А.3 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/60 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	35
Завершающая полимеризация	3 мин/72 °С

А.1.8 Специфичность продукта ПЦР

Так как представленный метод может рассматриваться исключительно как контрольный метод для определения качества выделенной ДНК, проверка специфичности основывается только на размере продукта ПЦР.

Если метод используется в целях, отличающихся от упомянутых выше, проверка специфичности продукта амплификации может быть выполнена с помощью гибридизации по Саузерну с использованием олигонуклеотидного зонда GM, меченного дигоксигенином (А.1.5.7 – А.1.5.10), или путем секвенирования (определения последовательности) продукта ПЦР и сравнения результатов с данными базы данных GenBank®, перечисленными в А.1.5.5.

А.1.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава, приготовленных из сои линии GTS 40-3-2 (например, серия стандартов IRMM-410 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в А.1.8.

Обнаружение фрагментов с размером 118 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК, происходящую из соевых бобов, в пределах установленных параметров специфичности, описанных в А.1.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

А.2 Метод, специфичный к целевому таксону, для определения многокопийных последовательностей ДНК, обычно присутствующих в хлоропластах растений

А.2.1 Общие положения

Описана стандартная процедура определения многокопийных последовательностей ДНК, обычно присутствующих в хлоропластах растений (интронгенахлоропластов *tmL*).

Этот метод пригоден для проверки успешности выделения ДНК из образца пищевого продукта, а также для оценки наличия амплифицируемой растительной ДНК. При анализе образцов продуктов, прошедших обработку, применение этого метода зависит от степени деградации ДНК.

Растительная клетка обычно содержит много копий этой последовательности ДНК, а размер целевой последовательности значительно превышает размеры последовательностей ДНК, используемых для обнаружения определенных генетических модификаций. Поэтому этот метод не может использоваться в качестве контроля при количественном определении.

Количество копий в клетке может быть различным у разных видов и тканей растений.

А.2.2 Порядок метрологической аттестации и критерии выполнения

А.2.2.1 Совместное сличительное испытание

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [13], организованном рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV) в соответствии со статьей 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице А.4.

Таблица А.4 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1995
Количество лабораторий	18
Количество лабораторий, представивших результаты	18
Количество образцов на лабораторию	10
Общее количество образцов	180
Количество принятых результатов	180
Количество образцов, содержащих картофель B33-INV	71
Количество образцов, содержащих генетически немодифицированный картофель	109
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

А.2.2.2 Молекулярная специфичность

А.2.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевых последовательностей, описанных в [14], например доступы базы данных GenBank® № Z00044, S54304, X15901.

А.2.2.2.2 Теоретическая часть

При поиске в базах данных (поиск NCBI BlastN®, база данных EMBL, по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не была обнаружена значимая схожесть с последовательностями ДНК нерастительного происхождения.

Были разработаны праймеры, предназначенные для амплификации уникальной последовательности ДНК хлоропластов (интрон, входящий в состав последовательности гена *trnL*); показано отсутствие схожести с нецелевыми последовательностями.

А.2.2.2.3 Экспериментальная часть

При использовании в ПЦР ДНК, выделенной из животных, грибов или бактерий, амплификация не была обнаружена [14].

Была показана амплификация ДНК, выделенной из водорослей, цианобактерий, мхов, птеридофитов, покрытосеменных и голосеменных растений [14].

Целевая последовательность была многокопийна и количество копий зависело от вида и типа тканей растений.

А.2.2.3 Предел обнаружения

Не был определен абсолютный предел обнаружения, однако с помощью флуорометрического анализа было показано, что метод способен обнаруживать по меньшей мере 0,1 нг ДНК соевых бобов.

А.2.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

А.2.4 Принцип

Принцип метода заключается в амплификации находящегося в гене тРНК хлоропластов фрагмента [14] длиной от 500 до 600 п. н. с использованием ПЦР и разделении с помощью электрофореза в агарозном геле.

А.2.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

А.2.5.1 Вода

А.2.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

А.2.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

А.2.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

А.2.5.5 Олигонуклеотиды

А.2.5.5.1 Прямой праймер

Ген тРНК хлоропластов (позиция базы данных GenBank® № Z00044, X15901).
Праймер c [14]: 5'-CgA AAT Cgg TAg ACg CTA Cg-3'.

А.2.5.5.2 Обратный праймер

Ген тРНК хлоропластов (позиция базы данных GenBank® № Z00044, X15901).
Праймер d [14]: 5'-ggg gAT AgA ggg ACT TgA AC-3'.

А.2.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза, 5 IU/мкл.

А.2.6 Оборудование

В соответствии с А.1.6.

А.2.7 Процедура анализа

А.2.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице А.5. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице А.5.

Таблица А.5 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	1
Вода		13,9
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,8 ммоль/л	2
Праймер c, 10 мкмоль/л	0,8 мкмоль/л	2
Праймер d, 10 мкмоль/л	0,8 мкмоль/л	2
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,5 IU	0,1
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

А.2.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава GTS 40-3-2, производимые Институтом референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-410).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно ISO 24276.

А.2.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице А.6, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или GeneAmp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [7]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

[7] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Таблица А.6 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	4 мин/94 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/55 °С 120 с/72 °С
Количество циклов	35
Завершающая полимеризация	5 мин/72 °С

А.2.8 Специфичность продукта ПЦР

Так как представленный метод может рассматриваться исключительно как контрольный метод для определения качества выделенной ДНК, точный размер фрагмента не играет большой роли. Таким образом, проверка специфичности основывается только на размере продукта ПЦР в пределах ожидаемого диапазона: от 500 до 600 п. н.

А.2.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава, приготовленных из сои линии GTS 40-3-2 (например, серия стандартов IRMM-410 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в А.2.8.

Обнаружение фрагментов с размером 500 – 600 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК растительного происхождения в пределах установленных параметров специфичности, описанных в А.2.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, B.2.

А.3 Метод, специфичный к целевому таксону, и метод скрининга ГМО для обнаружения ДНК, полученной из томатов и/или генетически модифицированных томатов Zeneca®

А.3.1 Общие положения

Описана стандартная процедура определения видоспецифичной однокопийной последовательности ДНК, встречающейся в томатах (*Lycopersicon esculentum* Mill).

Метод может быть также использован в качестве метода скрининга для обнаружения генетически модифицированных томатов с замедленным созреванием (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mill, сорт Alisa Craig, линия Nema 282F).

Не описан способ проверки идентичности ПЦР-продукта. Поэтому этот метод не может рассматриваться как метод идентификации. Он может быть использован для оценки амплифицируемости ДНК, выделенной из томатов.

А.3.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

А.3.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместных сличительных испытаниях [15], организованных рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV) в соответствии со статьей 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, A.3.

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице А.7.

Таблица А.7 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1998
Количество лабораторий	19
Количество лабораторий, представивших результаты	18
Количество образцов на лабораторию	5

Окончание таблицы А.7

Количество принятых результатов	90
Количество образцов, содержащих *Lycopersicon esculentum* Mill, сорт Alisa Craig, линия Nema 282F (Zeneca)	43
Количество образцов, содержащих *Lycopersicon esculentum* Mill, сорт Alisa Craig, линия Nema 282C (немодифицированный сорт)	47
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

Кроме того, в рамках европейского проекта SMT4-CT96-2072 Немецким федеральным институтом защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV) было проведено еще одно совместное сличительное испытание, соответствующее критериям, заданным в ISO 5275-2. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Таблица А.8 – Результаты второго совместного сличительного испытания

Год проведения испытаний	1998
Количество лабораторий	21
Количество лабораторий, представивших результаты	19
Количество образцов на лабораторию	10
Количество принятых результатов	190
Количество образцов, содержащих *Lycopersicon esculentum* Mill, сорт Alisa Craig, линия Nema 282F (Zeneca)	88
Количество образцов, содержащих *Lycopersicon esculentum* Mill, сорт Alisa Craig, линия Nema 282C (немодифицированный сорт)	102
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

А.3.2.2 Молекулярная специфичность

А.3.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевых последовательностей, описанных, например, в базе данных GenBank®, доступ № X04583.

А.3.2.2.2 Теоретическая часть

При поиске по базам данных (NCBI BlastN®, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не было обнаружено сходство с последовательностями ДНК других видов растений. Оба праймера на 100 % совпадали со следующими пунктами базы данных: X14074 (ген томатов, кодирующий полигалактуроназу, разрушающую клеточную стенку), X05656 (мРНК полигалактуроназы томатов), M37304 [ген полигалактуроназы томатов (PG)], X04583 (мРНК полигалактуроназы-2а томатов), A24194 (клон полигалактуроназы *L. esculentum*), A15981 (мРНК полигалактуроназы-2а *L. esculentum*), I01809 (последовательность нуклеотидов 1 из патента US4801540) и AX062336 (последовательность 1 из патента WO0078982).

А.3.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из других сельскохозяйственных растений, амплификация не была обнаружена [16].

Количество копий целевой последовательности не определяли, однако предполагалось, что это однокопийный ген.

А.3.2.3 Предел обнаружения

Не был определен абсолютный предел обнаружения, однако была показана возможность амплификации фрагмента ДНК по крайней мере из 0,1 нг ДНК, выделенной из свежих помидоров (значение определено флуорометрическим методом).

А.3.3 Адаптация

Анализ образцов, прошедших глубокую переработку, может дать отрицательный результат в связи с возможным отсутствием целевых фрагментов ДНК длиной не менее 383 п. н.

Обнаружение фрагментов длиной 383 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК томатов, в то время как обнаружение фрагментов длиной 180 п. н. свидетельствует о том, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК генетически модифицированных томатов (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mill, сорт Alisa Craig, линия Nema 282F).

А.3.4 Принцип

Ген полигалактуроназы (ген PG) кодирует фермент полигалактуроназу, связанный с созреванием. Этот метод основан на амплификации эндогенного гена (гена дикого типа) PG [17] с размером фрагмента 383 п. н. В генетически модифицированных томатах Zeneca с этой же парой праймеров будет амплифицироваться второй фрагмент длиной 180 п. н., так как эти томаты трансформировались к ДНК гена PG [18], [19].

А.3.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

А.3.5.1 Вода

А.3.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

А.3.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

А.3.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

А.3.5.5 Олигонуклеотиды

А.3.5.5.1 Прямой праймер

Ген PG (позиция базы данных GenBank® № X04583).

Праймер PG34L: 5'-ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT-3'.

А.3.5.5.2 Обратный праймер

Ген PG (позиция базы данных GenBank® № X04583).

Праймер PG34R: 5'-CgT Tgg TgC ATC CCT gCA Tgg -3'.

А.3.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

А.3.6 Оборудование

В соответствии с А.1.6.

А.3.7 Процедура анализа

А.3.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице А.9. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице А.9.

Таблица А.9 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	1
Вода		16,8
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1
Праймер PG34L, 10 мкмоль/л	0,4 мкмоль/л	1
Праймер PG34R, 10 мкмоль/л	0,4 мкмоль/л	1
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	1 IU	0,2
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

А.3.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей для метода, специфичного к целевому таксону, можно использовать ДНК из свежих томатов. Однако на рынке все еще нет положительного контроля для усеченного варианта гена, присутствующего в генетически модифицированных томатах [8)].

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

А.3.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице А.10, использовалась в совместном сличительном исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или GeneAmp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [9)]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица А.10 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	30 с/94 °С 60 с/60 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	35
Завершающая полимеризация	6 мин/72 °С

А.3.8 Специфичность продукта ПЦР

К настоящему моменту проверка специфичности основывается только на размере продукта ПЦР.

А.3.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из образцов стандартного состава, приготовленных из томатов.

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в А.3.8.

Обнаружение фрагментов с размером 383 п. н. и 180 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК, происходящую соответственно из томатов и генетически модифицированных томатов Zeneca, в пределах установленных параметров специфичности, описанных в А.3.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

А.4 Метод, специфичный к целевому таксону, для определения компонентов, полученных из кукурузы

А.4.1 Общие положения

Описана стандартная процедура определения видоспецифичного однокопийного гена инвертазы, встречающегося в кукурузе (*Zea mays*).

Не описан способ проверки идентичности ПЦР-продукта. Поэтому этот метод не может рассматриваться как метод идентификации. Он может быть использован для оценки амплифицируемости ДНК, выделенной из кукурузы.

[8)] Информация о наличии соответствующих стандартных образцов требует уточнения.

[9)] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

А.4.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

А.4.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в ходе нескольких совместных сличительных испытаний, организованных рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV) в соответствии со статьей 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Для выделения ДНК половина участников использовала метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3, а вторая половина – систему выделения ДНК Wizard® DNA-Clean-Up-System [10)].

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице А.11.

Таблица А.11 – Результаты совместных сличительных испытаний [20]

Год проведения испытаний	1999
Количество лабораторий	18
Количество лабораторий, представивших результаты	16
Количество образцов на лабораторию	6
Количество принятых результатов	96
Количество образцов, содержащих кукурузу Bt-176	32
Количество образцов, содержащих кукурузу Bt-11	32
Количество образцов, содержащих немодифицированную кукурузу	32
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

А.4.2.2 Молекулярная специфичность

А.4.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности, описанной в базе данных GenBank®, доступ № U16123.

А.4.2.2.2 Теоретическая часть

В качестве целевой последовательности из базы данных последовательностей ДНК был выбран ген инвертазы кукурузы.

При поиске по базам данных (NCBI BlastN®, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) была обнаружена некоторая гомология с последовательностями ДНК других сельскохозяйственных культур (бобовые, зерновые культуры, овощи) и ДНК человека и насекомых.

Результаты поиска гомологии по праймеру IVR1-F:

– AF171874 – растворимая кислая инвертаза IVR1 *Zea mays* (100%-ное совпадение);

– AX033517 – последовательность 25 из патента DE19906169 (совпадение по 21 смежному нуклеотиду);

– AX033514 – последовательность 22 из патента DE19906169 (совпадение по 21 смежному нуклеотиду).

Результаты поиска гомологии по праймеру IVR1-R:

– AF171874 – растворимая кислая инвертаза IVR1 *Zea mays* (100%-ное совпадение);

– AX150234 – последовательность 30 из патента WO0132919 (100%-ное совпадение);

– AJ224681 – мРНК бета-фруктозидазы *Triticum aestivum* (совпадение по 20 смежным нуклеотидам);

– AF062735 – растворимая кислая инвертаза *Saccharum officinarum* (совпадение по 19 смежным нуклеотидам);

– AF062734 – растворимая кислая инвертаза *Saccharum robustum* (совпадение по 19 смежным нуклеотидам).

Количество копий целевой последовательности не определяли, однако предполагалось, что это однокопийный ген.

[10)] Wizard® DNA-Clean-Up-System – это пример коммерчески доступного продукта. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO.

А.4.2.2.3 Экспериментальная часть

Метод ПЦР для кукурузы показал свою высокую специфичность к ДНК кукурузы [21].

А.4.2.3 Предел обнаружения

Не был определен абсолютный предел обнаружения, однако была показана возможность амплификации ≤ 0,1 нг ДНК, выделенной из зерен кукурузы [20] (значение определено флуорометрическим методом).

А.4.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

А.4.4 Принцип

Ген инвертазы кукурузы кодирует фермент метаболизма углеводов.

Принцип метода заключается в амплификации фрагмента ДНК длиной 226 п. н. от гена инвертазы кукурузы с использованием ПЦР и разделении с помощью электрофореза в агарозном геле.

А.4.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

А.4.5.1 Вода

А.4.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

А.4.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

А.4.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

А.4.5.5 Олигонуклеотиды

А.4.5.5.1 Прямой праймер

Ген инвертазы кукурузы (позиция базы данных GenBank® № U16123).

Праймер IVR1-F: 5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'.

А.4.5.5.2 Обратный праймер

Ген инвертазы кукурузы (позиция базы данных GenBank® № U16123).

Праймер IVR1-R: 5'-ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'.

А.4.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

А.4.6 Оборудование

В соответствии с А.1.6.

А.4.7 Процедура анализа

А.4.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице А.12. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице А.12.

Таблица А.12 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	2
Вода		15,3
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1
Праймер IVR1-F, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
ПраймерIVR1-R, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	1 IU	0,2
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

А.4.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава, например кукуруза Bt 11 (IRMM-412) или кукуруза Event 176 (Bt 176) (IRMM-411).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

А.4.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице А.13, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или GeneAmp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [11]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица А.13 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	12 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/64 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	35
Завершающая полимеризация	10 мин/72 °С

А.4.8 Специфичность продукта ПЦР

К настоящему моменту проверка специфичности основывается только на размере продукта ПЦР.

А.4.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава, приготовленных из кукурузы (например, IRMM-412 (кукуруза Bt 11) или IRMM-411 (кукуруза Event 176), производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в А.4.8.

Обнаружение фрагментов с размером 226 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК, происходящую из кукурузы, в пределах установленных параметров специфичности, описанных в А.4.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

[11] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Приложение В
(справочное)

Методы скрининга

В.1 Метод скрининга для обнаружения ДНК генетически модифицированных растений (промотор 35S вируса мозаики цветной капусты)

В.1.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения различного количества копий последовательности ДНК промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV). Так как промотор 35S присутствует во многих генетически модифицированных растениях, этот метод может быть использован для скрининга наличия ДНК из генетически модифицированного растения [22], [23].

В.1.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

В.1.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в нескольких совместных сличительных испытаниях с использованием различных материалов пищевых продуктов (как сырье, так и переработанные продукты) [24], [25].

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [24], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, A.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице В.1.

Таблица В.1 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1999
Количество лабораторий	27
Количество лабораторий, представивших результаты	23
Количество образцов на лабораторию	5
Количество принятых результатов	115
Количество образцов, содержащих сою линии GTS 40-3-2	59
Количество образцов, содержащих немодифицированную сою	56
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

В.1.2.2 Молекулярная специфичность

В.1.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности, описанной, например, в базе данных GenBank®, доступ № V00141.

Список генетически модифицированных растений, содержащих промотор 35S CaMV, приводится в приложении к ссылке [24].

Не исключается возможность получения ложноположительных результатов из-за того, что амплифицируемая последовательность получена из вируса мозаики цветной капусты, поражающего цветную капусту, а также другие растения семейств *Brassicaceae (Cruciferae)*, а также *Resedaceae* и *Solanaceae* [26], [27].

В связи с этим следует с особенной тщательностью рассматривать положительные результаты, полученные при анализе образцов из растений семейств *Brassicaceae, Resedaceae* и *Solanaceae*.

Положительные результаты могут означать наличие продукта, полученного из генетически модифицированных растений, однако не могут быть интерпретированы как доказательство наличия генетически модифицированного продукта без дополнительного подтверждения.

Для того чтобы различить инфицирование вирусом и генетическую модификацию, можно использовать методы обнаружения вируса мозаики цветной капусты [6].

B.1.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (NCBI BlastN®, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированными сельскохозяйственными растениями. Однако оба праймера совпадали с одним доступом базы данных, не относящимся ни к вирусу мозаики цветной капусты, ни к рекомбинантным векторам или патентам: S70105 cp (белок оболочки) вируса мозаики огурцов. Кроме того, праймеры соответствовали более чем 100 позициям базы данных, относящимся к вирусу мозаики цветной капусты и рекомбинантным векторам и патентам.

B.1.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированных сельскохозяйственных растений в отсутствие вируса мозаики цветной капусты, не наблюдали амплификации [22], [24], [25], [28].

Успешная амплификация была обнаружена при проведении ПЦР на ДНК, выделенной из различных генетически модифицированных растений, например GTS-40-3-2 (соевые бобы RoundUp Ready®), линий кукурузы Event 176 (Bt 176), Bt 11, MON 810, MON 809, а также томатов с замедленным созреванием (Zeneca) [22], [24], [25], [28].

Количество копий последовательности ДНК может варьироваться.

B.1.2.3 Предел обнаружения

Не был определен абсолютный предел обнаружения. Был показан относительный предел обнаружения, составляющий 0,1 % генетически модифицированной сои в соевой муке IRMM-410 и 0,1 % генетически модифицированной кукурузы Event 176 (Bt 176) IRMM-411 в кукурузной муке (массовая фракция) (сертифицированные образцы стандартного состава) [25].

B.1.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

B.1.4 Принцип

Принцип метода заключается в амплификации фрагмента ДНК длиной 195 пн из промотора 35S вируса мозаики цветной капусты с использованием ПЦР и обнаружением после разделения с помощью электрофореза в агарозном геле. Для проверки специфичности продукта ПЦР следует выполнить этап подтверждения.

Промоторы – это последовательности распознавания или связывающие последовательности для РНК-полимераз, которые отвечают за экспрессию генов. Промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты наиболее часто используется при генетической модификации растений [24].

B.1.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

B.1.5.1 Вода

B.1.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

B.1.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

B.1.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

B.1.5.5 Олигонуклеотиды

B.1.5.5.1 Прямой праймер

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, 35s-1: [24], [28] 5'-gCT CCT ACA AAT gCC ATC A-3'.

Подобран вместе с соответствующим обратным праймером для амплификации последовательностей, описанных, например, в позиции № V00141.

B.1.5.5.2 Обратный праймер

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, 35s-2: [24], [28] 5'-gAT AgT ggg ATT gTg CgT CA-3'.

Подобран вместе с соответствующим прямым праймером для амплификации последовательностей, описанных, например, в позиции № V00141.

В.1.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

В.1.5.7 Рестриктаза: *Xmn* I (= *Asp* 700).

В.1.6 Оборудование

В.1.6.1 Амплификатор

В.1.6.2 Камера для электрофореза, с источником питания.

В.1.7 Процедура анализа (проведение ПЦР)

В.1.7.1 Общие положения

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице В.2. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице В.2.

Таблица В.2 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	1
Вода		15,9
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,8 ммоль/л	2
Праймер 35s-1, 5 мкмоль/л	0,2 мкмоль/л	1
Праймер 35s-2, 5 мкмоль/л	0,2 мкмоль/л	1
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,5 IU	0,1
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

В.1.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава GTS 40-3-2 (материал, содержащий 0,1 % компонентов генетически модифицированных растений), производимые Институтом референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-410).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли, согласно описанию в ISO 24276.

В.1.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице В.3, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или GeneAmp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [12]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

[12] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Таблица В.3 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	20 с/ 94 °С 40 с/ 54 °С 60 с/ 72 °С
Количество циклов	40
Завершающая полимеризация	3 мин/72 °С

В.1.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности продукта ПЦР может быть выполнена с помощью его рестрикционного анализа рестриктазой *Xmn* I. В результате такой рестрикции ожидается получение двух фрагментов (длиной 115 и 80 п. н.) [22], [24].

В.1.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава (приготовленных, например, из серии стандартов IRMM-410 (соя линии GTS 40-3-2) производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в В.1.8.

Обнаружение фрагментов с размером 195 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из вируса мозаики цветной капусты или из генетически модифицированного растения в пределах установленных параметров специфичности, описанных в В.1.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

В.2 Альтернативный метод скрининга для обнаружения ДНК генетически модифицированных растений (промотор 35S вируса мозаики цветной капусты)

В.2.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения различного количества копий последовательности ДНК промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) в образцах продуктов, прошедших переработку. Так как промотор 35S присутствует во многих генетически модифицированных растениях, этот метод может быть использован для скрининга наличия ДНК из генетически модифицированного растения [22], [23], [29].

Не описан способ проверки специфичности ПЦР-продукта. Поэтому этот метод не может рассматриваться как метод идентификации. Он может быть использован для оценки амплифицируемости ДНК, содержащей целевую последовательность.

В.2.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

В.2.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод прошел метрологическую аттестацию в соответствии с критериями, заданными ISO 5725-2. В совместных сличительных испытаниях, координируемых объединенным центром исследований EC JRC, участвовали 23 европейские лаборатории [29], [30]. Оценивали способность метода обнаруживать ГМО в различных материалах образцов переработанной пищевой продукции (готовые продукты из кукурузы, детское питание, печенье, продукты из квашеных соевых бобов), каждый из которых содержал 0 %, 2 % и 100 % (для печенья использовали 10 % вместо 100 %) сои линии GTS-40-3-2 или кукурузы Event 176. Каждый участник получал 4 контрольных образца и 30 образцов неизвестного состава в независимых повторностях, из которых 10 содержали 0 % ГМО, а 20 – ингредиенты с различным процентом содержания генетических модификаций. Все участники получили подробное описание метода выделения ДНК с помощью методики ЦТАБ или коммерчески доступного набора для выделения. Однако лаборатории имели право использовать их собственные методы выделения ДНК; в то же время условия ПЦР должны были быть оптимизированы индивидуально для имеющегося у участников оборудования. От лабораторий требовали провести анализ каждого образца один раз и определить, содержит ли образец ГМО или нет. Так как большинство лабораторий предоставили правильные результаты (результаты 14 лабораторий попали в диапазон от 90 % до 100 % от истинного значения; результаты 3 лабораторий – от 80 % до 90 % от истинного значения) и

ни одна лаборатория не предоставила правильные результаты в диапазоне от 70 % до 80 %, было установлено значение среза правильных результатов, равное 80 %. Вследствие этого результаты 5 лабораторий были исключены из дальнейшей статистической обработки. Для не содержащих ГМО образцов было определено среднее значение правильных результатов, составившее 96,1 % (3,9 % ложноположительных результатов); для образцов, содержащих ГМО, было определено среднее значение правильных результатов, равное 98,1 % (1,9 % ложноотрицательных результатов) [30].

Результаты совместных сличительных испытаний приводятся в таблице В.4.

Таблица В.4 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1999
Количество лабораторий	30
Количество лабораторий, представивших результаты	18
Количество образцов на лабораторию	12
Общее количество образцов	360
Количество принятых результатов	540
Ложноположительные результаты	3,9 %
Ложноотрицательные результаты	1,9 %

В.2.2.2 Молекулярная специфичность

В.2.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности, описанной, например, в базе данных GenBank®, доступ № V00141. Список генетически модифицированных растений, содержащих промотор 35S CaMV, приводится в ссылках [23] и [24].

Не исключается возможность получения ложноположительных результатов из-за того, что амплифицируемая последовательность получена из вируса мозаики цветной капусты, поражающего цветную капусту, а также другие растения семейств *Brassicaceae (Cruciferae)*, а также *Resedaceae* и *Solanaceae* [26], [27].

В связи с этим следует с особенной тщательностью рассматривать положительные результаты, полученные при анализе образцов из растений семейств *Brassicaceae, Resedaceae* и *Solanaceae*. Положительные результаты могут означать наличие продукта, полученного из генетически модифицированных растений, однако не могут быть интерпретированы как доказательство наличия генетически модифицированного продукта без дополнительного подтверждения.

Для того чтобы различить инфицирование вирусом и генетическую модификацию, можно использовать методы обнаружения вируса мозаики цветной капусты [6].

В.2.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (NCBI BlastN®, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированными сельскохозяйственными растениями. Праймеры соответствовали значительному количеству позиций базы данных, относящихся к вирусу мозаики цветной капусты и рекомбинантным векторам и патентам.

В.2.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированных соевых бобов в ходе предварительных совместных сличительных исследований, не наблюдали амплификации [29].

В.2.2.3 Предел обнаружения

Для этого метода не был определен абсолютный предел обнаружения, однако была показана способность обнаружения по крайней мере 50 копий ДНК сои линии GTS 40-3-2 [29].

Также не был определен и относительный предел обнаружения, но в ходе совместных сличительных испытаний [28] была показана возможность обнаружения 2 % ГМО GTS 40-3-2 (соевые бобы RoundUp Ready®) и/или кукурузы Event 176 (кукуруза Bt 176) в печенье, детском питании и квашеных соевых бобах с 100 % правильных результатов [30].

В.2.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

В.2.4 Принцип

Принцип метода заключается в амплификации фрагмента ДНК длиной 123 п. н. из промотора 35S вируса мозаики цветной капусты с использованием ПЦР и обнаружении с помощью электрофореза в агарозном геле. Для проверки специфичности продукта ПЦР можно, например, использовать секвенирование ДНК. Однако ни одна из процедур подтверждения идентичности не прошла метрологической аттестации.

Промоторы – это последовательности распознавания или связывающие последовательности для РНК-полимераз, которые отвечают за экспрессию генов. Промотор 35S из вируса мозаики цветной капусты наиболее часто используется при генетической модификации растений [22].

В.2.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

В.2.5.1 Вода

В.2.5.2 Буфер для ПЦР, концентрация $MgCl_2$ = 15 ммоль/л, 10 ×.

В.2.5.3 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 4 ммоль/л (каждого).

В.2.5.4 Олигонуклеотиды

В.2.5.4.1 Прямой праймер

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, 35s-cf3: 5'-CCA CgT CTT CAA AgC AAg Tgg-3'.

Подобран для амплификации промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, например позиция № V00141.

В.2.5.4.2 Обратный праймер

Промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, 35s-cr4: 5'-TCC TCT CCA AAT gAA ATg AAC TTC C-3'.

Подобран для амплификации промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, например позиция № V00141.

В.2.5.5 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

В.2.6 Оборудование

В соответствии с описанием в В.1.6.

В.2.7 Процедура анализа

В.2.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице В.5. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице В.5.

Таблица В.5 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца		5
Вода		14,84
10 × буфер для ПЦР (с $MgCl_2$ 15 ммоль/л) [a]	1 ×	2,5
Раствор dNTP, 16 ммоль/л	0,64 ммоль/л	1
Праймер 35s-cf3, 20 мкмоль/л	0,6 мкмоль/л	0,75
Праймер 35S-cr4, 20 мкмоль/л	0,6 мкмоль/л	0,75
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,8 IU	0,16
[a] Если используется буферный раствор для ПЦР без $MgCl_2$, следует соответственно довести концентрации и объемы.		

В.2.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава GTS 40-3-2 (материал, содержащий 0,1 % компонентов генетически модифицированных растений), производимые Институтом референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-410).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

В.2.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице В.6, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов Perkin Elmer 2400/9600/9700 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [13]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо скрупулезно следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица В.6 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	25 с/95 °С 30 с/62 °С 45 с/72 °С
Количество циклов	50
Завершающая полимеризация	7 мин/72 °С

В.2.8 Специфичность продукта ПЦР

Рекомендуется проверить специфичность продукта ПЦР, полученного из неизвестного образца путем, например, рестрикционного анализа, секвенирования ДНК и ДНК-гибридизации.

В.2.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава (приготовленных, например, из серии стандартов IRMM-410 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в В.2.8.

Обнаружение фрагментов с размером 123 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК промотора 35S вируса мозаики цветной капусты в пределах установленных параметров специфичности, описанных в В.2.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

В.3 Метод скрининга для обнаружения ДНК генетически модифицированных растений (терминатор NOS *Agrobacterium tumefaciens*)

В.3.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения различного количества копий последовательности ДНК терминатора нопалин синтазы (NOS) из *Agrobacterium tumefaciens*. Так как терминатор NOS присутствует во многих генетически модифицированных растениях, этот метод может быть использован для скрининга наличия ингредиентов, полученных из генетически модифицированных растений [22], [23], [29], [30].

[13] Амплификаторы GeneAmp® 2400, 9600 и 9700 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Не описан способ проверки специфичности продукта ПЦР. Поэтому этот метод не может рассматриваться как метод идентификации. Он может быть использован для оценки амплифицируемости ДНК, содержащей целевую последовательность.

В.3.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

В.3.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод прошел метрологическую аттестацию в соответствии с критериями, заданными ISO 5725-2. В совместных сличительных испытаниях, координируемых объединенным центром исследований EC JRC, участвовали 23 европейские лаборатории [29], [30]. Оценивали способность метода обнаруживать ГМО в различных материалах образцов переработанной пищевой продукции (готовые продукты из кукурузы, детское питание, печенья, продукты из квашеных соевых бобов), каждый из которых содержал 0 %, 2 % и 100 % (для печенья использовали 10 % вместо 100 %) сои линии GTS 40-3-2 или кукурузы Event 176. Так как линия Event 176 не содержит последовательности терминатора NOS, образцы, содержащие компоненты, изготовленные из этой линии, не должны анализироваться этим методом. Однако в связи с тем, что совместные сличительные испытания были организованы для оценки метода обнаружения промотора 35S, лаборатории получили все образцы и провели их анализ. Результаты анализа готовых продуктов из кукурузы были исключены из дальнейшей статистической обработки.

Каждый участник получал 4 контрольных образца и 30 образцов неизвестного состава в независимых повторностях, из которых 10 содержали 0 % ГМО, а 20 – ингредиенты с различным процентом содержания генетических модификаций. Все участники получили подробное описание метода выделения ДНК с помощью методики ЦТАБ или коммерчески доступного набора для выделения. Однако лаборатории имели право использовать их собственные методы выделения ДНК; в то же время условия ПЦР должны были быть оптимизированы индивидуально для имеющегося у участников оборудования. От лабораторий требовали провести анализ каждого образца один раз и определить, содержит ли образец ГМО или нет. Так как большинство лабораторий предоставили правильные результаты (результаты 14 лабораторий попали в диапазон от 90 % до 100 % от истинного значения; результаты 3 лабораторий – от 80 % до 90 % от истинного значения) и ни одна лаборатория не предоставила правильные результаты в диапазоне от 70 % до 80 %, было установлено значение нижнего предела правильных результатов, равное 80 %. Вследствие этого результаты 5 лабораторий были исключены из дальнейшей статистической обработки. Так как линия Event 176 не содержит последовательности терминатора NOS, результаты анализа готовых продуктов из кукурузы должны быть отрицательными. Эти результаты имели высокий процент (100 %) правильных результатов и были исключены из дальнейшей статистической обработки.

Для не содержащих ГМО образцов было определено среднее значение правильных результатов, составившее 98,2 % (1,8 % ложноположительных результатов); для образцов, содержащих ГМО, было определено среднее значение правильных результатов, равное 97,9 % (2,1 % ложноотрицательных результатов) [29]. Результаты совместных сличительных испытаний приводятся в таблице В.7.

Таблица В.7 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1999
Количество лабораторий	30
Количество лабораторий, представивших результаты	18
Количество образцов на лабораторию	12
Общее количество образцов	360
Количество принятых результатов	540
Ложноположительные результаты	1,8 %
Ложноотрицательные результаты	2,1 %

В.3.2.2 Молекулярная специфичность

В.3.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности терминатора нопалин синтазы *Agrobacterium tumefaciens*, описанной в базе данных GenBank®, доступ № V00087.

Не исключается возможность получения ложноположительных результатов из-за того, что амплифицируемая последовательность получена из *Agrobacterium tumefaciens* – почвенной бактерии, распространенной в природе. Положительные результаты могут означать наличие компонента, произведенного из генетически модифицированного растения, однако интерпретация результатов не должна проводиться без дополнительного подтверждения. Следует принять в расчет возможность контаминации образца *Agrobacterium* или родственными микроорганизмами.

B.3.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (NCBI BlastN®, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированными сельскохозяйственными растениями. Следует учесть, что обратный праймер обнаружил 100%-ное совпадение с доступом AF015682 (полимераза вируса рваных листьев риса). Оба праймера соответствовали значительному количеству позиций базы данных, относящихся к векторам клонирования и патентам, а также к нопалин синтазе.

B.3.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированных сельскохозяйственных растений, в ходе предварительных совместных сличительных исследований не наблюдали амплификации [30].

B.3.2.3 Предел обнаружения

Для этого метода не был определен абсолютный предел обнаружения, однако была показана способность обнаружения по крайней мере 50 копий ДНК сои линии GTS 40-3-2 [29].

В ходе совместных сличительных испытаний была показана возможность обнаружения 2 % GTS 40-3-2 (соевые бобы RoundUp Ready®) в печенье, детском питании и квашеных соевых бобах с 96,4 % правильных результатов [29].

B.3.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

B.3.4 Принцип

Принцип метода заключается в амплификации фрагмента ДНК длиной 118 п. н. из терминатора NOS с использованием ПЦР и обнаружении с помощью электрофореза в агарозном геле. Для проверки специфичности продукта ПЦР можно, например, использовать секвенирование ДНК. Однако ни одна из процедур подтверждения специфичности продукта не прошла метрологической аттестации.

B.3.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

B.3.5.1 Вода

B.3.5.2 Буфер для ПЦР, концентрация $MgCl_2$ = 15 ммоль/л, 10 ×.

B.3.5.3 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 4 ммоль/л (каждого).

B.3.5.4 Олигонуклеотиды

B.3.5.4.1 Прямой праймер

Терминатор NOS *Agrobacterium tumefaciens*, HA-nos118f: 5'-gCA TgA CgT TAT TTA TgA gAT ggg-3'. Подобран для амплификации последовательности, описанной в доступе № V00087.

B.3.5.4.2 Обратный праймер

Терминатор NOS *Agrobacterium tumefaciens*, HA-nos118r: 5'-gAC ACC gCg CgC gAT AAT TTA TCC-3'. Подобран для амплификации последовательности, описанной в доступе № V00087.

B.3.5.5 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

B.3.6 Оборудование

В соответствии с B.1.6.

В.3.7 Процедура анализа (проведение ПЦР)

В.3.7.1 Общие положения

Описанный метод рассчитан на общий объем ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице В.8. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице В.8.

Таблица В.8 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца		5
Вода		14,84
10 × буфер для ПЦР (с $MgCl_2$ 15 ммоль/л) [a]	1 ×	2,5
Раствор dNTP, 16 ммоль/л	0,64 ммоль/л	1
Праймер HA-nos118f, 20 мкмоль/л	0,6 мкмоль/л	0,75
Праймер HA-nos118r, 20 мкмоль/л	0,6 мкмоль/л	0,75
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,8 IU	0,16
[a] Если используется буферный раствор для ПЦР без $MgCl_2$, следует соответственно довести концентрации и объемы.		

В.3.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава GTS 40-3-2 (материал, содержащий 0,1 % компонентов генетически модифицированных растений), производимые Институтом референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (RMM-410).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

В.3.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице В.9, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов Perkin Elmer 2400/9600/9700 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [14]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо скрупулезно следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица В.9 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	25 с/95 °С 30 с/62 °С 45 с/72 °С
Количество циклов	50
Завершающая полимеризация	7 мин/72 °С

В.3.8 Специфичность продукта ПЦР

Рекомендуется проверить идентичность продукта ПЦР, полученного из неизвестного образца путем, например, рестрикционного анализа, секвенирования ДНК и ДНК-гибридизации.

---

[14] Амплификаторы GeneAmp® 2400, 9600 и 9700 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

В.3.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава (приготовленных, например, из серии стандартов IRMM-410 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в В.3.8.

Обнаружение фрагментов с размером 118 п. н. показывает, что раствор образца ДНК содержит амплифицируемую ДНК терминатора NOS в пределах установленных параметров специфичности, описанных в В.3.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

В.4 Метод скрининга для обнаружения ДНК генетически модифицированных растений (ген *npt* II)

В.4.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения гена, кодирующего неомицин фосфотрансферазу (*npt* II). Так как этот ген вставлен в интегральные конструкции большинства генетически модифицированных растений, этот генетический элемент может быть использован для скрининга продуктов, в состав которых входят компоненты из ГМО.

В.4.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

В.4.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании на сырьевых продуктах [24], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2.

Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице В.10.

Таблица В.10 – Результаты совместных сличительных испытаний

Образец	Томаты Zeneca
Праймер	APH2 short/APH2 reverse
Год	1998
Количество лабораторий	10
Количество лабораторий, представивших результаты	9
Количество образцов на лабораторию	5
Количество принятых результатов	45
Количество образцов, содержащих ген неомицин фосфотрансферазы (томаты Zeneca)	22
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

В.4.2.2 Молекулярная специфичность

В.4.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности, описанной в базе данных GenBank®, доступ № AF269238.

Неомицин фосфотрансфераза получена из *E. coli* K12 и присутствует в некоторых ГМО.

Ген *npt* II получен из *E.coli* K12 и присутствует в некоторых ГМО.

Не исключается возможность получения ложноположительных результатов из-за того, что целевая последовательность получена из *E. coli* K12. Положительные результаты не должны служить доказательством наличия компонента, произведенного из генетически модифицированного растения.

B.4.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (NCBI BlastN®, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), по состоянию на 28 сентября 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированными сельскохозяйственными растениями. Праймеры обнаружили совпадение только с транспозоном Tn5, синтетическими и патентованными последовательностями.

B.4.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированных сельскохозяйственных растений и произведенных их них готовых продуктов, не наблюдали амплификации.

B.4.2.3 Предел обнаружения

Метрологическую аттестацию проводили только с образцами, содержащими 0 % и 100 % ГМО.

B.4.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

B.4.4 Принцип

Принцип метода заключается в амплификации фрагмента ДНК длиной 225 п. н. из последовательности гена неомицин фосфотрансферазы с использованием ПЦР и обнаружением с помощью электрофореза в агарозном геле. Для проверки специфичности продукта ПЦР можно, например, использовать рестрикционный анализ.

Неомицин фосфотрансфераза обеспечивает бактериям устойчивость к антибиотикам – неомицину/канамицину; ген добавляют в конструкции только в качестве маркера.

B.4.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

B.4.5.1 Вода

B.4.5.2 Буфер для ПЦР, концентрация $MgCl_2$ = 15 ммоль/л, 10 ×.

B.4.5.3 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

B.4.5.4 Олигонуклеотиды

B.4.5.4.1 Прямой праймер

APH2 short: 5'-CTC ACC TTg CTC CTg CCg AgA-3'.

B.4.5.4.2 Обратный праймер

APH2 reverse: 5'-CgC CTT gAg CCT ggC gAA CAg-3'.

B.4.5.5 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

B.4.5.6 Рестриктаза: *Rsa* I

B.4.6 Оборудование

В соответствии с описанием в B.1.6.

B.4.7 Процедура анализа (проведение ПЦР)

B.4.7.1 Общие положения

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице B.11. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице B.11.

Таблица B.11 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца		5
Вода		14,6
10 × буфер для ПЦР (с $MgCl_2$ 15 ммоль/л)	1 ×	2,5

Окончание таблицы В.11

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,2 ммоль/л	0,5
Праймер APH2 short, 10 мкмоль/л	0,4 мкмоль/л	1
Праймер APH2 reverse, 10 мкмоль/л	0,4 мкмоль/л	1
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	2 IU	0,4

В.4.7.2 Контроли ПЦР

К настоящему моменту на рынке отсутствуют доступные стандартные образцы. [15)]

В.4.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице В.12, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или GeneAmp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [16)]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица В.12 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	25 с/95 °С 30 с/60 °С 45 с/72 °С
Количество циклов	35
Завершающая полимеризация	7 мин/72 °С

В.4.8 Специфичность продукта ПЦР

Рекомендуется проверить идентичность продукта ПЦР, полученного из неизвестного образца путем, например, рестрикционного анализа, секвенирования ДНК и ДНК-гибридизации. Рестрикция продукта ПЦР ферментом *Rsa* I должна привести к образованию двух фрагментов (длиной 122 и 93 п. н. соответственно) [24].

В.4.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из соответствующих референсных материалов (например, коммерческих плазмид, содержащих целевую последовательность ДНК).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в В.4.8.

Обнаружение фрагментов с размером 215 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК гена *npt* II в пределах установленных параметров специфичности, описанных в В.4.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

В.5 Метод скрининга для обнаружения ДНК, выделенной из генетически модифицированных томатов (Zeneca® 282F)

Метод подробно описан в А.3.

[15)] Информация о наличии соответствующих стандартных образцов требует уточнения.

[16)] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Приложение С
(справочное)

Методы, специфичные к генетической конструкции

С.1 Специфичный к генетической конструкции метод обнаружения модифицированных последовательностей ДНК из генетически модифицированной сои GTS 40-3-2 (соевые бобы RoundUp Ready®)

С.1.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения генетически модифицированной, устойчивой к глифосату сои линии GTS 40-3-2 (RoundUp Ready® [17]) в сырье и переработанных продуктах [8], [11] путем амплификации однокопийной последовательности длиной 172 п. н., представляющей область стыка между промотором 35S вируса мозаики цветной капусты и сигнального гена хлоропласта *Petunia hybrida*, предшествующей последовательности гена EPSPS из *Agrobacterium*.

Эта конструкция используется и в других ГМО.

Этот метод невозможно использовать для разделения сои линии GTS 40-3-2 и селекционных сортов со сложным геномом, полученных при скрещивании сои GTS 40-3-2 и других модифицированных линий сои, за исключением применения метода на отдельных зернах и на растениях, для которых можно подтвердить наличие/отсутствие последовательностей, происходящих от других трансформационных событий.

С.1.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

С.1.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [8], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице С.1.

Таблица С.1 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1998
Количество лабораторий	25
Количество лабораторий, представивших результаты	24
Количество образцов на лабораторию	5
Количество принятых результатов	105
Количество образцов, содержащих сою линии GTS 40-3-2	56
Количество образцов, содержащих немодифицированную сою	49
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

С.1.2.2 Молекулярная специфичность

С.1.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был разработан для целевой последовательности, описанной в ссылке [8]. Информация о генетической конструкции, внесенной в геном сои, приводится в ссылке [31].

[17] RoundUp Ready – это зарегистрированная торговая марка компании Monsanto. Эта информация приводится для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этого продукта организацией ISO.

С.1.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (база данных GenBank®, BlastN® 2.2.1, по состоянию на 1 июля 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированными линиями сои, а также с другими сельскохозяйственными растениями. Более того, набор праймеров был подобран для амплификации специфической последовательности ДНК, присутствующей только в искусственной, не встречающейся в природе области стыка.

С.1.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированных соевых бобов, картофеля, томатов, кукурузы и сахарной свеклы [32] или генетически модифицированных линий кукурузы Event 176 (Bt 176), Bt 11, T 25 и MON 810, не наблюдали амплификации.

С.1.2.3 Предел обнаружения

При определении абсолютного предела обнаружения основывались на следующих предположениях: имеется только одна копия генетической конструкции на гаплоидный геном (база данных AGBIOS: gost.e-ecolog.ru), а размер гаплоидного генома сои составляет $1{,}13 \times 10^9$ п. н. (см. [5]). Значение абсолютного предела обнаружения в перемолотых бобах определили как 40 эквивалентов гаплоидного генома [32] с 50 нг ДНК из соевых бобов с относительным содержанием ГМО по массовой фракции 0,1 %.

Относительный предел обнаружения определили как равный или больший массовой фракции 0,1 % соевых бобов в соевой муке (сертифицированный образец стандартного состава IRMM-410R, произведенный IRMM, Гиль, Бельгия) [9]. Было также показано, что с помощью этого метода возможно обнаружить 0,45 % GTS 40-3-2 в соевой муке после выпечки [33].

С.1.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

С.1.4 Принцип

Устойчивость сои GTS 40-3-2 к глифосату обеспечивается внедрением в геном генетической конструкции, кодирующей 5-энолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза (EPSPS) из штамма CP4 *Agrobacterium sp*, входящей в состав последовательности белка – переносчика хлоропласта из *Petunia hybrida* (сигнальная последовательность переноса, CTP, служит для переноса EPSPS в хлоропласты). Глифосат ингибирует EPSPS в растениях. Принцип метода заключается в амплификации путем ПЦР фрагмента ДНК длиной 172 п. н., охватывающего стык между последовательностью промотора 35S вируса мозаики цветной капусты и последовательностью CTP, с последующим обнаружением с помощью электрофореза в агарозном геле.

С.1.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

С.1.5.1 Вода

С.1.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

С.1.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

С.1.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

С.1.5.5 Олигонуклеотиды

С.1.5.5.1 Прямой праймер

35s-f2: 5'-TgA TgT gAT ATC TCC ACT gAC g-3'.

Позиции № (база данных GenBank®) V00141, J02048.

С.1.5.5.2 Обратный праймер

petu-r1: 5'-TgT ATC CCT TgA gCC ATg TTg T-3'.

Позиции № (база данных GenBank®) M21084, J03227.

С.1.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

С.1.5.7 Зонд для гибридизации

H-35s-ar1: 5'-ggg TCT TgC gAA ggA TAg Tg-3'.

С.1.5.8 Прегибридизационный раствор, содержащий 5 × SSC, 0,1 % (по массе) N-лаурилсаркозина, 0,02 % (по массе) додецил сульфата натрия (SDS) и 1 % блокирующего реактива Blocking Reagent [8].

С.1.5.9 Раствор для гибридизации, содержащий 10 пмоль зонда для гибридизации в 2,5 мл прегибридизационного раствора (С.1.5.8). Температура гибридизации – 50 °С. Дополнительная информация по условиям гибридизации приводится в [12].

С.1.6 Оборудование

С.1.6.1 Амплификатор

С.1.6.2 Камера для электрофореза, с источником питания.

С.1.6.3 Прибор для гибридизации

С.1.7 Процедура анализа

С.1.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице С.2. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице С.2.

Таблица С.2 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	1
Вода		15,9
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,8 ммоль/л	2
Праймер 35s-f2, 5 мкмоль/л	0,2 мкмоль/л	1
Праймер petu-r1, 5 мкмоль/л	0,2 мкмоль/л	1
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,5 IU	0,1
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

С.1.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава GTS 40-3-2 (материал, содержащий 0,1 % компонентов генетически модифицированных растений), производимые Институтом референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-410).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

С.1.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице С.3, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp™ 2400 или Gene Amp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [18]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо скрупулезно следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

[18] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Таблица С.3 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/60 °С 25 с/72 °С
Количество циклов	От 35 до 40
Завершающая полимеризация	3 мин/72 °С

С.1.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности амплифицированного продукта может быть выполнена с помощью гибридизации по Саузерну с использованием меченного флуоресцеином зонда H-35s-ar1 (С.1.5.7 – С.1.5.9). Немодифицированные образцы должны дать отрицательные результаты в таком гибридизационном анализе [8].

С.1.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных образцов стандартного состава сои линии GTS 40-3-2 (например, из серии стандартов IRMM-410 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в С.1.8.

Обнаружение фрагментов с размером 172 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из сои линии GTS 40-3-2 в пределах установленных параметров специфичности, описанных в С.1.2.2. Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

С.2 Специфичный к генетической конструкции метод обнаружения модифицированных последовательностей ДНК из генетически модифицированных томатов (Zeneca® 282F)

С.2.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения генетически модифицированных томатов с замедленным созреванием в сырье путем амплификации области стыка между элементами последовательностей однокопийного гена из *Agrobacterium tumefaciens* (терминатор NOS) и гена полигалактуроназы (PG) из *Lycopersicon esculentum* Mill, соединенных путем рекомбинации *in vitro*.

Эта конструкция может быть в будущем использована и в других ГМО.

Этот метод невозможно использовать для разделения томатов Zeneca 282F и селекционных сортов со сложным геномом, полученных при скрещивании Zeneca 282F и других модифицированных линий томатов, за исключением применения метода на отдельных зернах и на растениях, для которых можно подтвердить наличие/отсутствие последовательностей, происходящих от других событий трансформации.

С.2.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

С.2.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [15], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3 (однако вес анализируемой части образца составлял 100 мг).

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице С.4.

Таблица С.4 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	1999
Количество лабораторий	18
Количество лабораторий, представивших результаты	18
Количество образцов на лабораторию	5
Количество принятых результатов	90
Количество образцов, содержащих генетически модифицированные томаты (Zeneca 282F)	43
Количество образцов, содержащих немодифицированные томаты (Zeneca 282C)	47
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

С.2.2.2 Молекулярная специфичность

С.2.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод описан в ссылках [15] и [16]. Информация о генетической конструкции, внесенной в геном томатов, приводится в ссылке [18].

С.2.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (база данных GenBank®, BlastN® 2.2.1, по состоянию на 1 июля 2001 г.) не обнаружил существенной гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированными томатами, а также с другими сельскохозяйственными растениями. Более того, набор праймеров был подобран для амплификации специфической последовательности ДНК, присутствующей только в искусственной, не встречающейся в природе области стыка.

С.2.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированных томатов со сходными фенотипами: томаты *Long-Life* типа Selfesta F1, Seduro F1, Lioba F1 и Harzglut F1 (производство семенного материала Quedlinburg, Германия) [15], не наблюдали амплификацию.

С.2.2.3 Предел обнаружения

При определении абсолютного предела обнаружения основывались на следующих предположениях: имеется только одна копия генетической конструкции на гаплоидный геном (база данных AGBIOS: gost.e-ecolog.ru), а размер гаплоидного генома томата составляет $1{,}0 \times 10^9$ п. н. (см. [5]). Значение абсолютного предела обнаружения в томатах определили как 10 эквивалентов гаплоидного генома [19] с 10 пг ДНК из томатов с относительным содержанием ГМО по массовой фракции 100 % в сырых томатах.

С.2.3 Адаптация

Для обнаружения генетической модификации в томатной пасте рекомендуется выделять нуклеиновую кислоту из объема образца, в пять раз превышающего количество, определяемое ISO 21571. После объединения ДНК всех выделений используйте дополнительный этап очистки с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit [19)], что позволит получить достаточное количество ДНК для проведения ПЦР.

С.2.4 Принцип

Особенностью генетически модифицированных томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill), разработанных компанией Zeneca, является замедленное созревание плода, обусловленное ингибированием продукции полигалактуроназы (PG).

[19)] QIAquick PCR Purification Kit – это торговая марка коммерческого продукта, поставляемого компанией QIAGEN, Гильден, Германия. Эта информация приводится для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Генетическая модификация в этих томатах заключается во внедрении в геном дополнительного неполного гена полигалактуроназы (PG) в качестве кДНК. Наличие этого гена приводит к резкому снижению количества эндогенного фермента полигалактуроназы томатов. Этот фермент играет принципиальную роль в созревании томатов [17].

Принцип метода заключается в амплификации путем ПЦР фрагмента ДНК длиной 350 п. н., охватывающего искусственный стык между сегментом фрагмента к ДНК гена PG и соседней последовательностью терминатора NOS. Такая комбинация присутствует только в генетически модифицированных томатах. Полученный продукт ПЦР может быть обнаружен с помощью электрофореза в агарозном геле. Проверка специфичности продукта ПЦР может быть выполнена с помощью описанного далее специфичного гибридизационного зонда.

С.2.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

С.2.5.1 Вода

С.2.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

С.2.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

С.2.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

С.2.5.5 Олигонуклеотиды

С.2.5.5.1 Прямой праймер

PG34L: 5'-ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT-3'.
Позиция № X04583.

С.2.5.5.2 Обратный праймер

t-NOS: 5'-CAT CgC AAg ACC ggC AAC Ag-3'.
Позиция № NC002147.

С.2.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

С.2.5.7 Зонд для гибридизации, Tomate-2

Меченный дигоксигенином ДНК зонд (Tomate-2) имеет следующую последовательность:
5'-Dig-CCT CTA gAg Tcg ACC TgC Agg TCg -3'.

С.2.5.8 Прегибридизационный раствор, содержащий 5 × SSC, 0,1 % (по массе) N-лаурилсаркозина, 0,02 % (по массе) додецил сульфата натрия (SDS) и 1 % блокирующего реактива Blocking Reagent [15].

С.2.5.9 Раствор для гибридизации, содержащий 10 пмоль зонда для гибридизации в 2,5 мл прегибридизационного раствора (С.2.5.8).

Температура гибридизации – 60 °С. Дополнительная информация по условиям гибридизации приводится в ссылке [12].

С.2.5.10 Рестриктаза: *Eae* I или *Mwo* I.

С.2.6 Оборудование

В соответствии с С.1.6.

С.2.7 Процедура анализа

С.2.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице С.5. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице С.5.

Таблица С.5 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	0,5
Вода		17,3
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5

Окончание таблицы С.5

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1,0
Праймер PG34L, 10 мкмоль/л	0,4 мкмоль/л	1,0
Праймер t-NOS, 10 мкмоль/л	0,4 мкмоль/л	1,0
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	1 IU	0,2
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

С.2.7.2 Контроли ПЦР

К настоящему моменту на рынке отсутствуют доступные референсные материалы, которые можно было бы использовать в качестве положительного контроля. [20)]

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

С.2.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице С.6, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или Gene Amp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [21)]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица С.6 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	10 мин/95 °С
Амплификация	30 с/94 °С 60 с/60 °С 60 с/72 °С
Количество циклов	35
Завершающая полимеризация	6 мин/72 °С

С.2.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности амплифицированного продукта может быть выполнена с помощью гибридизации по Саузерну с использованием меченного дигоксигенином зонда Tomate-2 (С.2.5.7 – С.2.5.9). Немодифицированные образцы должны дать отрицательные результаты в таком гибридизационном анализе.

Специфичность амплифицированного продукта может быть проверена с помощью рестрикционного анализа с использованием ферментов *Eae* I или *Mwo* I. Рестрикция ферментом *Eae* I дает два фрагмента длиной 126 и 224 п. н. соответственно. Рестрикция ферментом *Mwo* I дает три фрагмента длиной 8, 164 и 178 п. н. соответственно.

С.2.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из соответствующих референсных материалов.

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в С.2.8.

[20)] Информация о наличии соответствующих стандартных образцов требует уточнения.

[21)] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Обнаружение фрагментов с размером 350 п.н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из генетически модифицированных томатов Zeneca в пределах установленных параметров специфичности, описанных в С.2.2.2. Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

С.3 Специфичный к генетической конструкции метод обнаружения модифицированных последовательностей ДНК из генетически модифицированной кукурузы Bt 11

С.3.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения генетически модифицированной кукурузы Bt 11, производящей токсин *Bacillus thuringiensis* (компания Syngenta, ранее Novartis), в сырье путем амплификации области стыка между элементами последовательностей однокопийного гена из adh 1S-Intron2 (IVS2) кукурузы и гена *pat* из *Streptomyces viridochromogenes*.

Эта конструкция может быть в будущем использована и в других ГМО.

Этот метод невозможно использовать для разделения кукурузы Bt 11 и селекционных сортов со сложным геномом, полученных при скрещивании кукурузы Bt 11 и других модифицированных линий кукурузы, за исключением применения метода на отдельных зернах и на растениях, для которых можно подтвердить наличие/отсутствие последовательностей, происходящих от других событий трансформации.

С.3.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

С.3.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [20], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК половина участников использовала метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3, а другая половина – систему выделения ДНК Wizard® DNA-Clean-Up-System [22)].

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице С.7.

Таблица С.7 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	2000
Количество лабораторий	18
Количество лабораторий, представивших результаты	16
Количество образцов на лабораторию	6
Количество принятых результатов	96
Количество образцов, содержащих кукурузу Bt 11	32
Количество образцов, содержащих кукурузу Event 176	32
Количество образцов, содержащих немодифицированную кукурузу	32
Ложноположительные результаты	3 (5 %)
Ложноотрицательные результаты	3 (10 %)

Кроме того, 14 лабораторий дополнительно получили образцы ДНК, выделенные из генетически модифицированной кукурузы Bt 11 и содержащие 50; 5; 0,5 и 0,05 нг. Результаты исследования приводятся в таблице В8 [20].

[22)] Wizard® DNA-Clean-Up-System – это пример коммерчески доступного продукта. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO.

Таблица С.8 – Результаты совместных сличительных испытаний

Количество ДНК	Результаты		Примечание
	Правильно	Неправильно	
50 нг	14	–	
5 нг	14	–	
0,5 нг	12	1	Ложноотрицательный
		1	Спорный
0,05 нг	7	5	Ложноотрицательный
		2	Спорный

С.3.2.2 Молекулярная специфичность

С.3.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Информация о генетической конструкции, внесенной в геном кукурузы, приводится в ссылке [34]. Конструкция ДНК – это конструкция, описанная в доступе № AR110602 базы данных EMBL/GenBank® (конструкция запатентована) и содержащая те же элементы и в том же порядке, что и конструкция для Bt 11.

С.3.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (база данных GenBank®, BlastN® 2.2.1, по состоянию на 1 июля 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированной кукурузой, а также с другими сельскохозяйственными растениями. Более того, набор праймеров был подобран для амплификации специфической последовательности ДНК, присутствующей только в искусственной, не встречающейся в природе области стыка.

С.3.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированной кукурузы или генетически модифицированной сои GTS 40-3-2 (соя RoundUp Ready®) или кукурузы линий Event 176 (Bt 176), T 25 и MON 810, не наблюдали амплификации.

Количество целевых последовательностей равно одному.

С.3.2.3 Предел обнаружения

При определении абсолютного предела обнаружения основывались на следующих предположениях: имеется только одна копия генетической конструкции на геном (база данных AGBIOS: gost.e-ecolog.ru), а размер генома кукурузы составляет $2{,}65 \times 10^9$ п. н. (см. [5]). Значение абсолютного предела обнаружения в перемолотых зернах определили как 20 эквивалентов гаплоидного генома [34] с 50 нг ДНК из кукурузы с относительным содержанием ГМО по массовой фракции 0,1 % в перемолотой кукурузе. Относительный предел обнаружения был лучше или равен 0,1 % в перемолотых зернах кукурузы [34].

С.3.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

С.3.4 Принцип

Ген Bt присутствует в почвенной бактерии *Bacillus thuringiensis*; белок, синтезируемый в генетически модифицированном растении с внесенным геном Bt, защищает растение от поражения личинками европейского зернового сверлильщика. Белок Bt активизируется в кишечнике этих насекомых, приводя к образованию пор в мембране клетки, что вызывает нарушение осмотического баланса и лизис клеток.

Ген *pat* присутствует в почвенной бактерии *Streptomyces viridochromogenes* и кодирует фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу, которая обеспечивает устойчивость растения к гербициду (к глюфосинату аммония). Глюфосинат аммония нарушает синтез глютамина в растениях. Принцип метода заключается в амплификации путем ПЦР фрагмента ДНК длиной 189 п. н., охватывающего стык между *adh* интроном IVS2 и последовательностью гена *pat*. Полученный продукт ПЦР может быть обнаружен с помощью электрофореза в агарозном геле. Проверка специфичности продукта ПЦР может быть выполнена с помощью описанного далее специфичного зонда для гибридизации.

С.3.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

С.3.5.1 Вода

С.3.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

С.3.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

С.3.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

С.3.5.5 Олигонуклеотиды

С.3.5.5.1 Прямой праймер

Интрон IVS2-2: 5'-CTg ggA ggC CAA ggT ATC TAA T-3'.
Позиция № AR110602.

С.3.5.5.2 Обратный праймер

Кодирующий участок белка PAT, PAT-B: 5'-gCT gCT gTA gCT ggC CTA ATC T-3'.
Позиция № AR110602.

С.3.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

С.3.5.7 Зонд для гибридизации, 5'-меченый (например, дигоксигенином) зонд Bt: 5'-TAT CTg TCT CAg ggg CAg ACT C-3', концентрация = 20 мкмоль/л.

С.3.5.8 Прегибридизационный раствор, содержащий 5 × SSC, 0,1 % (по массе) N-лаурилсаркозина, 0,02 % (по массе) додецил сульфата натрия (SDS) и 1 % блокирующего реактива Blocking Reagent.

С.3.5.9 Раствор для гибридизации, содержащий 10 пмоль зонда для гибридизации в 2,5 мл прегибридизационного раствора (С.3.5.7). Температура гибридизации – 60 °С. Дополнительная информация по условиям гибридизации приводится в ссылке [12].

С.3.5.10 Рестриктаза

Hinf I.

С.3.6 Оборудование

В соответствии с С.1.6.

С.3.7 Процедура анализа

С.3.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице С.9. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице С.9.

Таблица С.9 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	1
Вода		15,8
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	2 ммоль/л	2,0
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1,0
Праймер IVS2-2, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
Праймер PAT-B, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	1 IU	0,2
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 2 ммоль/л.		

С.3.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава, например материал, содержащий 1 % генетически модифицированной кукурузы Bt 11, производства Института референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-412).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

С.3.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице С.10, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400 или GeneAmp® 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [23]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы.

Таблица С.10 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	12 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/64 °С 30 с/72 °С
Количество циклов	38
Завершающая полимеризация	10 мин/72 °С

С.3.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности амплифицированного продукта может быть выполнена с помощью гибридизации по Саузерну с использованием меченного дигоксигенином зонда Bt (С.3.5.7 – С.3.5.9). Немодифицированные образцы должны дать отрицательные результаты в таком гибридизационном анализе [20].

Специфичность амплифицированного продукта может быть проверена с помощью рестрикционного анализа с использованием фермента *Hinf* I. Рестрикция этим ферментом дает два фрагмента длиной 116 и 73 п. н. соответственно [20].

С.3.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных референсных материалов, приготовленных из кукурузы Bt 11 (например, серия IRMM-412, производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в С.3.8.

Обнаружение фрагментов с размером 118 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из генетически модифицированной кукурузы Bt 11 в пределах установленных параметров специфичности, описанных в С.3.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, приложение В.2.

[23] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

С.4 Специфичный к генетической конструкции метод обнаружения модифицированных последовательностей ДНК из генетически модифицированной кукурузы Event 176 (кукуруза Bt 176)

С.4.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения генетически модифицированной кукурузы Event 176 (производства Syngenta) в сырье и переработанных продуктах путем амплификации искусственной области стыка между двумя копиями генетической конструкции, перенесенной в геном растения. Целью модификации кукурузы был синтез токсина Bt (типа cryIA(b)) из *Bacillus thuringiensis* путем вставки синтетического гена Bt, регулируемого промотором CPDK из *Zea mays*.

Эта конструкция может быть в будущем использована и в других ГМО.

Этот метод не позволяет распознавать селекционные сорта со сложным геномом, за исключением применения метода на отдельных зернах и растениях.

С.4.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

С.4.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [20], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК половина участников использовала метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3, а другая половина – систему выделения ДНК Wizard® DNA-Clean-Up-System [24)].

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблице С.11.

Таблица С.11 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	2000
Количество лабораторий	18
Количество лабораторий, представивших результаты	16
Количество образцов на лабораторию	6
Количество принятых результатов	96
Количество образцов, содержащих кукурузу Bt 11	32
Количество образцов, содержащих кукурузу Event 176	32
Количество образцов, содержащих немодифицированную кукурузу	32
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

Кроме того, 13 лабораторий дополнительно получили образцы ДНК, выделенные из генетически модифицированной кукурузы Event 176 (кукуруза Bt 176) с массовой фракцией 0,1 % ГМО в виде сухой кукурузной муки (сертифицированные референсные образцы стандартного состава, приготовленные IRMM, Гиль, Бельгия). Двенадцать лабораторий представили положительные по содержанию Event 176 (Bt 176) результаты, а одна лаборатория представила результаты как спорные (определено в двух повторах) [20].

С.4.2.2 Молекулярная специфичность

С.4.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод был описан в ссылках [20] и [35].

Информация о генетической конструкции, перенесенной в геном кукурузы, приводится в ссылке [35].

[24)] Wizard® DNA-Clean-Up-System – это пример коммерчески доступного продукта. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO.

С.4.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (база данных GenBank®, BlastN® 2.2.1, по состоянию на 1 июля 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированной кукурузой, а также с другими сельскохозяйственными растениями. Более того, набор праймеров был подобран для амплификации специфической последовательности ДНК, присутствующей только в искусственной, не встречающейся в природе области стыка.

С.4.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из генетически модифицированной сои (GTS 40-3-2) и кукурузы линий Bt 11, T 25 и MON 810 [11] или немодифицированной кукурузы [11], [20], не наблюдали амплификации.

Количество копий последовательностей равно двум.

С.4.2.3 Предел обнаружения

При определении абсолютного предела обнаружения основывались на следующих предположениях: имеются две копии генетической конструкции на геном (база данных AGBIOS: gost.e-ecolog.ru), а размер генома кукурузы составляет $2{,}65 \times 10^9$ п. н. (см. [5]). Значение абсолютного предела обнаружения в перемолотых зернах определили как 20 эквивалентов гаплоидного генома [34] с 50 нг ДНК из кукурузы с относительным содержанием ГМО по массовой фракции 0,1 % в перемолотой кукурузе. Относительный предел обнаружения был выше или равен 0,1 % в перемолотых зернах кукурузы [34].

С.4.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

С.4.4 Принцип

Токсин Bt *Bacillus thuringiensis* – это инсектицид бактериального происхождения. Генетически модифицированные растения, содержащие ген Bt, продуцируют продукт гена как эндогенный пестицид. Кукуруза Event 176 (кукуруза Bt 176) содержит синтетический ген Bt типа CryIA(b) под контролем промотора CPDK6. Принцип метода заключается в амплификации методом ПЦР фрагмента ДНК длиной 211 п. н., охватывающего стык между промотором CPDK6 и последовательностью гена Bt. Полученный продукт ПЦР может быть обнаружен с помощью электрофореза в агарозном геле. Проверка специфичности продукта ПЦР может быть выполнена с помощью описанного далее специфичного зонда для гибридизации.

С.4.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

С.4.5.1 Вода

С.4.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

С.4.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

С.4.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

С.4.5.5 Олигонуклеотиды

С.4.5.5.1 Прямой праймер

Cry03: 5'-CTC TCg CCg TTC ATg TCC gT-3'.

Номер позиции в базе данных отсутствует. Праймер локализован на промоторе CPDK6. Праймер на 100 % соответствует CPDK кукурузы, позиция № L27484.1.

С.4.5.5.2 Обратный праймер

Cry04: 5'-ggT CAg gCT Cag gCT gAT gT-3'.

Позиция № 41419 (согласно ссылке [36]). Праймер локализован на синтетическом гене CryIA(b).

С.4.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

С.4.5.7 Зонд для гибридизации (Cry01)

5'-ATg gAC AAC AAC CCC AAC ATC-3'.

С.4.5.8 Прегибридизационный раствор, содержащий 5 × SSC, 0,1 % (по массе) N-лаурилсаркозина, 0,02 % (по массе) додецил сульфата натрия (SDS) и 1 % блокирующего реактива Blocking Reagent.

С.4.5.9 Раствор для гибридизации, содержащий 10 пмоль зонда для гибридизации в 2,5 мл прегибридизационного раствора (С.4.5.8).

Температура гибридизации – 50 °С. Дополнительная информация по условиям гибридизации приводится в [12].

С.4.6 Оборудование

В соответствии с описанием в С.1.6.

С.4.7 Процедура анализа

С.4.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице С.12. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице С.12.

Таблица С.12 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	2
Вода		15,4
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	1,5 ммоль/л	1,5
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1,0
Праймер Cry03, 5 мкмоль/л	0,25 мкмоль/л	1,25
Праймер Cry04, 5 мкмоль/л	0,25 мкмоль/л	1,25
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	0,5 IU	0,1
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 1,5 ммоль/л.		

С.4.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительных контролей можно использовать сертифицированные образцы стандартного состава (материал, содержащий 0,1 % генетически модифицированной кукурузы Event 176 (Bt 176), например, производства Института референсных материалов и измерений (IRMM), Гиль, Бельгия (IRMM-411, MZ-0,1).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

С.4.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице С.13, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400, 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [25]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица С.13 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	12 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/63 °С 30 с/72 °С
Количество циклов	38
Завершающая полимеризация	6 мин/72 °С

[25] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

С.4.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности амплифицированного продукта может быть выполнена с помощью гибридизации по Саузерну с использованием меченного дигоксигенином зонда Cry01 (С.4.5.7 – С.4.5.9). Немодифицированные образцы должны дать отрицательные результаты в таком гибридизационном анализе [20].

Специфичность амплифицированного продукта может быть проверена с помощью рестрикционного анализа с использованием ферментов *Hae* III, *Taq* I или *Dde* I. Рестрикция ферментом *Hae* III дает два фрагмента длиной 162 и 49 п. н. соответственно. Рестрикция ферментом *Taq* I дает три фрагмента длиной 168, 22 и 21 п. н. соответственно [20]. Рестрикция ферментом *Dde* I дает три фрагмента длиной 128, 72 и 11 п. н. соответственно [20].

С.4.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных референсных материалов, приготовленных из кукурузы Event 176 (Bt 176) (например, серия IRMM-411 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в С.4.8.

Обнаружение фрагментов с размером 211 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из кукурузы Event 176 (Bt 176) в пределах установленных параметров специфичности, описанных в С.4.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, В.2.

С.5 Специфичный к генетической конструкции метод обнаружения модифицированных последовательностей ДНК из генетически модифицированной кукурузы Т 25

С.5.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения генетически модифицированной кукурузы Т 25/«Liberty-Link» в сырье путем амплификации однокопийной области стыка между последовательностями ДНК из промотора 35S вируса мозаики цветной капусты и гена *pat*, соединенных путем рекомбинации *in vitro*.

Эта конструкция может быть в будущем использована и в других ГМО.

Этот метод не позволяет распознавать селекционные сорта со сложным геномом, за исключением применения метода на отдельных зернах и растениях.

С.5.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

С.5.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [20], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, А.3.

Для совместных сличительных испытаний были подготовлены образцы муки (перемолотые зерна) из кукурузы линий Т 25 (0,1 %, 1 %), MON 810 (0,1 %, 1 %) и из немодифицированной кукурузы.

Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблицах С.14 и С.15.

Таблица С.14 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	2001
Количество лабораторий	16
Количество лабораторий, представивших результаты	16
Количество образцов на лабораторию	5
Количество принятых результатов	75
Количество образцов, содержащих кукурузу Т25	33
Количество образцов, содержащих кукурузу MON 810	31
Количество образцов, содержащих немодифицированную кукурузу	11
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	4 (12 %)

Таблица С.15 – Подробные результаты совместных сличительных испытаний

Тип образца	Количество образцов	Правильно	Неправильно
Образцы, не содержащие T25			
0 % ГМО	11	11	0
0,1 % MON 810	13	13	0
1 % MON 810	18	18	0
Образцы, содержащие T25			
0,1 % T25	18	15	3 (отриц.) [a]
1 % T25	15	14	1 (отриц.)
[a] Все три отрицательных результата были получены в одной лаборатории.			

С.5.2.2 Молекулярная специфичность

С.5.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод описан в ссылке [20].

Примечание – Информация о последовательности для разработки этого метода была предоставлена компанией Bayer Crop Science (ранее Aventis Crop Science).

Информация о генетической конструкции, перенесенной в геном кукурузы, приводится в ссылке [37].

С.5.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (база данных GenBank®, BlastN® 2.2.1, по состоянию на 1 июля 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированной кукурузой, а также с другими сельскохозяйственными растениями. Более того, набор праймеров был подобран для амплификации специфической последовательности ДНК, присутствующей только в искусственной, не встречающейся в природе области стыка.

С.5.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированной кукурузы или генетически модифицированных сои GTS 40-3-2 (соя RoundUp Ready®) или кукурузы линий Event 176 (Bt 176), Bt 11 и MON 810, не наблюдали амплификации.

Количество копий последовательностей равно одному.

С.5.2.3 Предел обнаружения

При определении абсолютного предела обнаружения основывались на следующих предположениях: имеется только одна копия генетической конструкции на геном (база данных AGBIOS: gost.e-ecolog.ru), а размер генома кукурузы составляет 2,65 × 10^9 п. н. (см. [5]). Значение абсолютного предела обнаружения в перемолотых зернах определили как 20 эквивалентов гаплоидного генома [34] с 50 нг ДНК из кукурузы с относительным содержанием ГМО по массовой фракции 0,1 % в перемолотой кукурузе. Относительный предел обнаружения был выше или равен 0,1 % в перемолотых зернах кукурузы [34].

С.5.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

С.5.4 Принцип

Ген *pat* присутствует в почвенной бактерии *Streptomyces viridochromogenes* и кодирует фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу, которая обеспечивает устойчивость растения к гербициду (к глюфосинату аммония). Глюфосинат аммония нарушает синтез глютамина в растениях.

Принцип метода заключается в амплификации методом ПЦР фрагмента ДНК длиной 209 п. н., охватывающего стык между промотором 35S вируса мозаики цветной капусты и последовательностью гена *pat*. Полученный продукт ПЦР может быть обнаружен с помощью электрофореза в агарозном геле. Проверка специфичности продукта ПЦР может быть выполнена с помощью описанного далее рестрикционного анализа.

С.5.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

С.5.5.1 Вода

С.5.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

С.5.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

С.5.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

С.5.5.5 Олигонуклеотиды

С.5.5.5.1 Прямой праймер

T25-F7: 5'-ATg gTg gAT ggC ATg ATg TTg-3'.

Позиция (в базе данных GenBank®) № NC001497. Праймер локализован на промоторе 35S вируса мозаики цветной капусты.

С.5.5.5.2 Обратный праймер

T25-R3: 5'-TgA gCg AAA CCC TAT AAg AAC CC-3'.

Позиция в базе данных отсутствует. Праймер локализован на кодирующем участке белка PAT.

С.5.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

С.5.5.7 Рестриктаза: *Hin*f I и *Mwo* I.

С.5.6 Оборудование

В соответствии с описанием в С.1.6.1 и С.1.6.2.

С.5.7 Процедура анализа

С.5.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем смеси ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице С.16. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице С.16.

Таблица С.16 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	2
Вода		14,8
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	2 ммоль/л	2,0
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1,0
Праймер T25-F7, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
Праймер T25-R3, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	1 IU	0,2
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 2 ммоль/л.		

С.5.7.2 Контроли ПЦР

В настоящее время на рынке отсутствуют стандартные образцы для контроля [26)].

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

[26)] Информация о наличии соответствующих стандартных образцов требует уточнения.

С.5.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице С.17, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400, 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [27]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

Таблица С.17 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	12 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/64 °С 30 с/72 °С
Количество циклов	40
Завершающая полимеризация	10 мин/72 °С

С.5.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности амплифицированного продукта может быть выполнена с помощью рестрикционного анализа с использованием ферментов *Hin*f I или *Mwo* I. Рестрикция ферментом *Hin*f I дает два фрагмента длиной 121 и 88 п. н. соответственно. Рестрикция ферментом *Mwo* I дает два фрагмента длиной 141 и 68 п. н. соответственно [20].

С.5.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из соответствующих референсных материалов, приготовленных из кукурузы Т 25.

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в С.5.8.

Обнаружение фрагментов с размером 209 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из генетически модифицированной кукурузы Т 25 в пределах установленных параметров специфичности, описанных в С.5.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, B.2.

[27] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Приложение D
(справочное)

Методы, специфичные к трансформационным событиям

D.1 Специфичный к трансформационному событию метод обнаружения модифицированных последовательностей ДНК из генетически модифицированной кукурузы MON 810

D.1.1 Общие положения

Этот метод предназначен для обнаружения генетически модифицированной, защищенной от насекомых-вредителей кукурузы MON 810 в сырье путем амплификации однокопийной области границы интеграции последовательности генома и последовательности вставки, включающей в себя промотор 35S вируса мозаики цветной капусты, соединенных путем рекомбинации *in vitro*.

Этот метод не позволяет распознавать селекционные сорта со сложным геномом, за исключением применения метода на отдельных зернах и растениях.

D.1.2 Метрологическая аттестация и критерии выполнения

D.1.2.1 Совместные сличительные испытания

Этот метод был метрологически аттестован в совместном сличительном испытании [20], проведенном под руководством рабочей группы «Разработка методов идентификации пищевой продукции, произведенной с использованием технологий генной инженерии» Немецкого федерального института защиты здоровья потребителей и ветеринарной медицины (BgVV). Количество участников, а также количество образцов устанавливали в соответствии с критериями ISO 5725-2. Для выделения ДНК использовали метод ЦТАБ, описанный в ISO 21571:2005, A.3.

Для совместных сличительных испытаний были подготовлены образцы муки (перемолотые зерна) из кукурузы MON 810 DK 513/59179 (0,1 %, 1 %), T25 (0,1 %, 1 %) и из немодифицированной кукурузы. Данные совместных сличительных испытаний приводятся в таблицах D.1 и D.2.

Таблица D.1 – Результаты совместных сличительных испытаний

Год проведения испытаний	2001
Количество лабораторий	16
Количество лабораторий, представивших результаты	16
Количество образцов на лабораторию	5
Количество принятых результатов	75
Количество образцов, содержащих кукурузу MON 810	31
Количество образцов, содержащих кукурузу T25	33
Количество образцов, содержащих немодифицированную кукурузу	11
Ложноположительные результаты	0 (0 %)
Ложноотрицательные результаты	0 (0 %)

Таблица D.2 – Подробные результаты совместных сличительных испытаний

Тип образца	Количество образцов	Правильно	Неправильно
Образцы, не содержащие MON 810			
0 % ГМО	11	11	0
0,1 % T25	18	18	0
1 % T25	15	15	0
Образцы, содержащие MON 810			
0,1 % MON 810	13	13	0
1 % MON 810	18	18	0

D.1.2.2 Молекулярная специфичность

D.1.2.2.1 Общие положения

Это приложение удовлетворяет требованиям, изложенным в разделе 7.

Метод описан в ссылке [20].

Примечание – Информация о последовательности для разработки этого метода была предоставлена компанией Monsanto.

Информация о генетической конструкции, перенесенной в геном кукурузы, приводится в ссылке [38].

D.1.2.2.2 Теоретическая часть

Поиск по базам данных (база данных GenBank®, BlastN® 2.2.1, по состоянию на 1 июля 2001 г.) не обнаружил гомологии целевой последовательности ДНК с немодифицированной кукурузой, а также с другими сельскохозяйственными растениями. Более того, набор праймеров был подобран для амплификации специфической последовательности ДНК, присутствующей только в искусственной и не встречающейся в природе области стыка (участок границы вставки).

D.1.2.2.3 Экспериментальная часть

При проведении ПЦР с использованием ДНК, выделенной из немодифицированной кукурузы, генетически модифицированной сои GTS 40-3-2 (соя RoundUp Ready®) или кукурузы линий Event 176 (Bt 176), Bt 11 и T 25, не наблюдали амплификации.

Количество копий последовательностей равно одному.

D.1.2.3 Предел обнаружения

При определении абсолютного предела обнаружения основывались на следующих предположениях: имеется только одна копия генетической конструкции на геном (база данных AGBIOS: gost.e-ecolog.ru), а размер генома кукурузы составляет 2,65 × 10^9 п. н. (см. [5]). Значение абсолютного предела обнаружения в перемолотых зернах определили как 20 эквивалентов гаплоидного генома [34] с 50 нг ДНК из кукурузы с относительным содержанием ГМО по массовой фракции 0,1 % в перемолотой кукурузе. Относительный предел обнаружения был выше или равен 0,1 % в перемолотых зернах кукурузы [34].

D.1.3 Адаптация

Отсутствует конкретная информация.

D.1.4 Принцип

Ген Bt присутствует в почвенной бактерии *Bacillus thuringiensis* подвид *kurstaki*. Белок, синтезируемый в тканях генетически модифицированного растения с перенесенным геном Bt, защищает растение от поражения личинками европейского зернового сверлильщика. Белок Bt активизируется в кишечнике этих насекомых, приводя к образованию пор в мембране клетки, что вызывает нарушение осмотического баланса и лизис клеток.

Принцип метода заключается в амплификации методом ПЦР фрагмента ДНК длиной 170 п. н., охватывающего стык между промотором 35S вируса мозаики цветной капусты и последовательностью генома кукурузы. Полученный продукт ПЦР может быть обнаружен с помощью электрофореза в агарозном геле. Проверка специфичности продукта ПЦР должна выполняться с помощью описанного далее рестрикционного анализа (см. D.1.8).

D.1.5 Реактивы

Информация по качеству используемых реактивов приводится в ISO 24276.

D.1.5.1 Вода

D.1.5.2 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10 ×.

D.1.5.3 Раствор $MgCl_2$, концентрация $MgCl_2$ = 25 ммоль/л.

D.1.5.4 Раствор dNTP, концентрация dNTP = 2,5 ммоль/л (каждого).

D.1.5.5 Олигонуклеотиды

Информация по участку границы вставки была опубликована [38] в позиции базы данных № AF434709.

D.1.5.5.1 Прямой праймер

VW01: 5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA Cg-3'.

Позиция № AF434709. Праймер локализован на геноме кукурузы.

D.1.5.5.2 Обратный праймер

VW03: 5'-TCC ATC TTT ggg ACC ACT gTC g-3'.

Позиции (в базе данных GenBank®) № V00141, J02048. Праймер локализован на промоторе 35S вируса мозаики цветной капусты.

D.1.5.6 Термостабильная ДНК-полимераза (для ПЦР с «горячим стартом»), 5 IU/мкл.

D.1.5.7 Рестриктаза: *Mwo* I и *Hae* III.

D.1.6 Оборудование

D.1.6.1 Амплификатор

D.1.6.2 Камера для электрофореза, с источником питания.

D.1.7 Процедура анализа

D.1.7.1 Проведение ПЦР

Описанный метод рассчитан на общий объем ПЦР 25 мкл на реакцию; используемые реактивы перечислены в таблице D.3. ПЦР можно проводить и в больших объемах при условии соблюдения соответствующих пропорций для растворов реактивов. Доказано получение корректных результатов при использовании конечных концентраций реактивов, перечисленных в таблице D.3.

Таблица D.3 – Добавление реактивов

Реактив	Конечная концентрация	Объем на образец, мкл
ДНК из образца	От 10 до 50 нг	2
Вода		14,8
10 × буфер для ПЦР (без $MgCl_2$)	1 ×	2,5
Раствор $MgCl_2$ [a], 25 ммоль/л	2 ммоль/л	2,0
Раствор dNTP, 10 ммоль/л	0,4 ммоль/л	1,0
Праймер VW01, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
Праймер VW03, 10 мкмоль/л	0,5 мкмоль/л	1,25
ДНК-полимераза Taq, 5 IU/мкл	1 IU	0,2
[a] Если буферный раствор для ПЦР уже содержит $MgCl_2$, конечную концентрацию $MgCl_2$ в реакционной смеси доводят до 2 ммоль/л.		

D.1.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительного контроля можно использовать сертифицированные референсные материалы IRMM-413 (производства IRMM).

Кроме того, следует использовать и другие соответствующие исследованию контроли согласно описанию в ISO 24276.

D.1.7.3 Программа «температура – время»

Программа «температура – время», описанная в таблице D.4, использовалась в исследовании по метрологической аттестации метода, проводившемся с использованием амплификаторов GeneAmp® 2400, 9600 и ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold® [28)]. Использование других амплификаторов, возможно, потребует адаптации программы. Время активации/начальной денатурации зависит от используемой полимеразы. При использовании полимеразы с «горячим стартом» необходимо следовать рекомендациям производителя, если это не противоречит применяемому протоколу.

[28)] Амплификаторы GeneAmp® 2400 и 9600 и полимераза AmpliTaq Gold® – это пример коммерчески доступных продуктов, производимых компанией Applied Biosystems, ранее известной как Perkin Elmer/Applied Biosystems. Эта информация приводится исключительно для ознакомления пользователей настоящего стандарта и ни при каких условиях не может служить рекомендацией или одобрением этих продуктов организацией ISO. Допускается использование аналогичных продуктов, если показано, что они позволяют получать такие же результаты.

Таблица D.4 – Программа «температура – время»

Активация/начальная денатурация	12 мин/95 °С
Амплификация	30 с/95 °С 30 с/64 °С 30 с/72 °С
Количество циклов	40
Завершающая полимеризация	10 мин/72 °С

D.1.8 Специфичность продукта ПЦР

Проверка специфичности амплифицированного продукта может быть выполнена с помощью рестрикционного анализа с использованием ферментов *Hae* III или *Mwo* I. Рестрикция ферментом *Hae* III дает два фрагмента длиной 126 и 44 п. н. соответственно. Рестрикция ферментом *Mwo* I дает два фрагмента длиной 109 и 61 п. н. соответственно.

D.1.9 Общий контроль качества и интерпретация результатов

Предполагается, что целевая последовательность обнаружена, если размер продукта ПЦР соответствует ожидаемой длине целевой последовательности ДНК, определенной путем сравнения с продуктами реакции, полученными из сертифицированных референсных материалов, приготовленных из кукурузы MON 810 (например, серия IRMM-413 производства IRMM, Гиль, Бельгия).

Проверка специфичности продукта ПЦР описана в D.1.8.

Обнаружение фрагментов с размером 170 п. н. показывает, что раствор ДНК образца содержит амплифицируемую ДНК из генетически модифицированной кукурузы MON 810 в пределах установленных параметров специфичности, описанных в D.1.2.2.

Подробная информация об этапах электрофореза приводится в ISO 21571:2005, B.2.

Библиография

[1] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A, and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of G-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985, 230, pp. 1350–1354
(Ферментная амплификация генетических последовательностей гемоглобина и анализ сайта рестрикции для диагностики серповидноклеточной анемии)

[2] Mullis, K. B. and Faloona, FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed reaction. Methods Enzymol., 1987, 155, pp. 335–350
(Специальный синтез ДНК in vitro с катализатором полимеразой. Методы ферментологии)

[3] Heaton, P.A.: Quantification of total DNA by spectroscopy. In Analytical Molecular Biology: Quality and Validation, ed. Saunders, G.S and Parkes, H.C. RSC publications, 1999, U.K
(Общая количественная оценка ДНК средствами спектроскопии. Опубликовано: Аналитическая молекулярная биология. Качество и валидация)

[4] Bickley and Hopkins: Inhibitors and enhancers of PCR in Analytical Molecular Biology: Quality and Validation, ed. Saunders, G.S and Parkes, H.C. RSC publications, 1999, U.K
(Ингибиторы и катализаторы ПЦР в аналитической молекулярной биологии. Качество и валидация)

[5] Arumuganathan, K. and Earle, E.D.: Nuclear content of some important plant species, Plant Mol. Biol. Rep., 9(3), 1991 / pp. 208–218
(Устройство клеточного ядра у некоторых важных видов растений. Молекулярная биология растений)

[6] Wolf, C., Scherzinger, M., Wurz, A., Pauli, U., Hubner, P., and Luthy, J.: Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. Eur. Food Res. Techno!., 2000, 210, pp. 367–372
(Обнаружение вируса мозаики цветной капусты с использованием цепной реакции полимеразы: испытания пищевых компонентов на ложноположительные результаты скрининга 35S-промотора. Европейские исследования и технология в области пищевой продукции)

[7] Holst-Jensen, A., Ronning, S.B., L0VSETH, A. and BERDAL, K.G.: PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). Anal. Bioanal. Chem., 2003, 375, pp. 985–993
(Технология ЦПР для скрининговых испытаний и количественного определения генетически модифицированных организмов (ГМО). Аналитическая и биоаналитическая химия)

[8] Detection of a genetic modification of soybeans by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe, No. L 23.01.22-1. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of March 1998, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH
(Обнаружение генетически модифицированных соевых бобов путем амплификации измененной последовательности ДНК с использованием цепной реакции полимеразы (PCR) и гибридизации продуктов ПЦР с пробой ДНК, №. L 23.01.22-1 // Сборник официально утвержденных методов согласно ст. 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Методы отбора проб и анализа пищевой продукции, табачной продукции, косметики и промышленных товаров / Федеральное ведомство здравоохранения, листовое издание по состоянию на март 1998 г.)

[9] Report of the EU tender No. XXIV/98/A3/001. Development of qualitative as well as quantitative detection methods to Identify a genetic modification in soybean and maize.
gost.e-ecolog.ru
(Отчет о проведении тендера ЕС № XXIV/98/A3/001. Разработка методов качественного и количественного определения для обнаружения генетически модифицированных сои и кукурузы)

[10] Meyer, R., Chardonnens, F., hubner, P., and Luthy, J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of Soya in processed meat products. Z Lebensm. Unters. Forsch., 1996,203, pp. 339–344
(Использование цепной реакции полимеразы (ЦПР) в целях обеспечения качества и безопасности пищевой продукции: обнаружение сои в продуктах мясопереработки // Испытания и исследования пищевых продуктов)

[11] Broll, H., Wagner, U., Spiegelberg, A., Zagon, J., and Schauzu, M.: Anwendung von Methoden zum Nachweis von gentechnisch veranderten Sojabohnen und gentechnisch verendertem Mais in im Handel befindlichen Lebensmitteln, Bundesgesundhblatt, 1998,12, pp. 560–562
(Применение методов обнаружения генетически модифицированных соевых бобов и генетически модифицированной кукурузы в пищевых продуктах, представленных в торговой сети // Федеральный бюллетень по здравоохранению)

[12] Sambrook, J. and Russell, D.W.: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001
(Молекулярное клонирование: лабораторное руководство)

[13] Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe, No. L 24.01-1: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of January 1997, Berlin, K6ln, Beuth Verlag GmbH
(Обнаружение генетически модифицированного картофеля путем амплификации измененных последовательностей ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продуктов с пробой ДНК, № L 24.01-1 // Сборник официально утвержденных методов согласно ст. 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Методы отбора проб и анализа пищевой продукции, табачной продукции, косметики и промышленных товаров / Федеральное ведомство здравоохранения, листовое издание по состоянию на январь 1997 г.)

[14] Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., and B.J.: Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol., 1991,17, pp. 1105–1109
(Универсальные праймеры для амплификации трех некодирующих регионов ДНК хлоропластов. Молекулярная биология растений)

[15] Detection of a genetic modification of tomatoes by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe or restriction analysis of the PCR product, No. L 25.03.01. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of November 1999, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH
(Обнаружение генетически модифицированных томатов путем амплификации измененных последовательностей ДНК с использованием цепной реакции полимеразы (ПЦР) и гибридизации продуктов ПЦР с пробой ДНК или анализа рестрикции продуктов ПЦР, № L 25.03.01 // Сборник официально утвержденных методов согласно ст. 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Методы отбора проб и анализа пищевой продукции, табачной продукции, косметики и промышленных товаров / Федеральное ведомство здравоохранения, листовое издание по состоянию на ноябрь 1997 г.)

[16] Busch, U., Muhlbauer, B., Schulze, M., and Zagon, J.: Screening- und spezifische Nachweismethode fur transgene Tomaten (Zeneca) mit der Polymerasekettenreaktion. Deutsche Lebensmittelrundschau, 1999, Heft 2, 52–56
(Скрининг и специальная методика обнаружения трансгенных томатов (Zeneca) с использованием цепной реакции полимеразы. Германское обозрение пищевых продуктов)

[17] Gierson, E., Tucker, G.A., Keen, J., Ray, J., Bird, C.R., and Schuch, W.: Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. Nucleic Acid Research, 1986,14, pp. 8595–8603
(Секвенирование и выявление клонированной кДНК полигалактуроназы томатов. Исследования нуклеиновых кислот)

[18] Smith, C.J.S., Watson, C.F., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W., and Gierson, D.: Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. /Wo/. Gen. Genet, 1990, 224, pp. 477–481
(Подавление экспрессией укороченного гена полигалакуроназы томатов экспрессии эндогенного гена у трансгенных растений. Общая генетика)

[19] Broll, H., Jansen,B., Spiegelberg, A., Leffke.A., Zagon, J., and Schauzu, M.: DNA-analytische Nachweismethoden fur gentechnisch veranderte Tomaten in Tomatenprodukten. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 1999, 95, 48–51
(Основанные на анализе ДНК методы обнаружения генетически модифицированных томатов в продуктах переработки томатов // Германское обозрение пищевых продуктов)

[20] Detection of a genetic modification of maize (Zea mays L.) by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe or restriction analysis of the PCR product, No. L 15.05-1. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of May 2002, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH
(Обнаружение генетически модифицированной кукурузы (Zea mays L.) путем амплификации измененной последовательности ДНК с использованием цепной реакции полимеразы (ПЦР) и гибридизации продуктов ПЦР с пробой ДНК или анализом рестрикции продуктов ПЦР, № L 15.05-1 // Сборник официально утвержденных методов согласно ст. 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Методы отбора проб и анализа пищевой продукции, табачной продукции, косметики и промышленных товаров / Федеральное ведомство здравоохранения, листовое издание по состоянию на май 2002 г.)

[21] Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H.ғ Maidhof, H., Bendiek, J., Appel, B. and Buhk, H.-J.: Nachweis gentechnischer Veranderungen in Mais mittels PCR. Bundesgesundhbl., 1997, 4, pp. 118–121
(Обнаружение генетически модифицированной кукурузы с использованием ПЦР // Федеральный бюллетень по здравоохранению)

[22] Pietsch, K., Waibunger, H.U., Brodmann, P. and WURZ, A: Screening method for the detection of genetically modified plants, Dtsch Lebensm. Rundsch. 1997, 93, pp. 35–38
(Обнаружение генетически модифицированных растений методом скрининга // Германское обозрение пищевых продуктов)

[23] Hemmer, W.: Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. In: BATS-report (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, pp. 40–44
(Пищевые продукты, полученные из генетически измененных организмов и методы их обнаружения: отчет BATS (Агентство по исследованиям в сфере биологической безопасности и оценке технологических угроз, действующее в рамках Швейцарской программы приоритетных разработок в области биотехнологии Швейцарского национального научного общества)

[24] Screening procedure for the detection of genetically modified DNA sequences in foods by identification of DNA sequences that frequently occur in genetically modified organisms. No L 00.00-31. Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, K6ln, Beuth Verlag GmbH
(Процедура скрининга для определения генетически измененных последовательностей ДНК в пищевых продуктах путем выявления последовательностей ДНК, часто встречающихся в генетически модифицированных организмах. № L 00.00-31 // Сборник официально утвержденных методов согласно ст. 35 Федерального закона Германии о пищевых продуктах. Методы отбора проб и анализа пищевой продукции, табачной продукции, косметики и промышленных товаров / Федеральное ведомство здравоохранения, листовое издание по состоянию на сентябрь 2002 г.)

[25] Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., and Anklam, E.: IUPAC Collaborative trial of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder, J. AO AC Int., 1999, 82, pp. 923–928
(Межлабораторные сравнительные испытания МСТПХ метода обнаружения генетически модифицированных соевых бобов и кукурузы в сухом порошке // Журнал Международной ассоциации официальной аналитической химии)

[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
(Возбудители вирусных заболеваний растений: описания и перечни из базы данных)

[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
(Возможность связи светозависимого системного заражения растений семейства пасленовых мозаичным вирусом цветной капусты с кодированием вирусным геном фактора переноса растительными тлями. Вирусология)

[28] Schweizerisches Lebensmittelhandbuch Kapitel 52B, Eidgenossische Drucksachen- und Materialienzentrale, Bern, 1998
(Швейцарское руководство по пищевым продуктам. Глава 52B. Швейцарский центр печатных изданий и материалов)

[29] van den Eede, G., Lipp, M., Eyquem, F. and Anklam, E.: Validation of an analytical method for the detection of GMO-derived DNA in processed foodstuffs. EUR 19677 EN, Report issued by the IHCP ISPRA, 2000
(Валидация аналитического метода обнаружения генетически модифицированной ДНК в продуктах пищевой переработки)

[30] Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L, Schimmel, H., van den Eede, G. and Anklam, E. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. Eur Food Res. Technol., 2001, 212, pp 497-504
(Валидация метода, основанного на цепной реакции полимеразы, для обнаружения генетически модифицированных организмов в различных продуктах пищевой переработки. Европейские исследования и технология в области пищевой продукции)

[31] 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, DA, Peschke, V.M., Nida, D.L, Taylor, N.B., Kishore, G.M.: Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Sci. 35,1995, pp. 1451–1461
(Создание, определение и характеристика глифозат-толерантной линии соевых бобов. Растениеводство)

[32] Wurz, A., Willmund, R.: Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans. In: G.A. Schreiber, K.W. Bogl (Eds.). Foods produced by means of genetic engineering – 2nd status report. BgVV-Heft 1/1997 (BgW, Berlin), pp. 115–117
(Определение трансгенных глифозат-устойчивых соевых бобов / Г. А. Шрайбер, К. В. Богль (ред.) // Пищевые продукты, полученные средствами генной инженерии: 2-й отчет о состоянии работ / Журнал Федерального ведомства по защите потребителей и ветеринарной медицине 1/1997)

[33] Straub, J.A., Hertel, C. and Hammes, W.P.: Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. Z Lebensm Unters Forsch A, 208, 1999, pp. 77–82
(Ограничения, основанные на ПЦР метода обнаружения генетически модифицированных соевых бобов при производстве белого хлеба // Испытания и исследования пищевых продуктов)

[34] Zimmermann, A., Luthy, J., Pauli, U.: Event specific transgene detection in Bt 11 corn by quantitative PCR at the integration site. Lebensm.- Wiss. U. Technol., 33, 2000, pp. 210–216
(Ситуативное обнаружение измененных генов в зерне Bt11 при помощи количественной ПЦР на сайте интеграции. Пищевые продукты // Наука и технология)

[35] 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 генетических модификаций в продуктах тепловой обработки кукурузы Bt с использованием цепной реакции полимеразы // Испытания и исследования пищевых продуктов)

[36] Vaitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. and Brignon, P.: Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady soybean in some representative foods. J. Agric. Food Chem. 47, 1999, pp. 5261–5266
(Количественное определение с использованием ПЦР генетически модифицированой кукурузы-максимайзер и сои «Раундап Реди» в некоторых важных видах пищевых продуктов // Журнал сельскохозяйственной химии и химии пищевых продуктов)

[37] Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda,Y., Kusakabe.Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A.: A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. Journal of Food Hygienic Society of Japan, 41, 2000, pp. 137-143
(Метод обнаружения рекомбинантных ДНК в четырех линиях генетически модифицированной кукурузы // Журнал Японского общества гигиены пищевых продуктов)

[38] Holck, A., Vaitilingom, M., Didierjean, L, Rudi, K.: 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. Eur Food Res Technol, 214, 2002, pp. 449–454
(ПЦР 5'-нуклеазы при ситуативном количественном определении генетически модифицированной кукурузы Mon810 MaisGard. Европейские исследования и технология в области пищевой продукции)

[39] 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)

[40] ISO 21568 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Sampling
(Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Отбор проб)

[41] ISO 21570:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods
(Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 21571:2005 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и их производных. Извлечение нуклеиновой кислоты	IDT	ГОСТ ISO 21571-2009 * Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Экстрагирование нуклеиновых кислот

* На территории Республики Беларусь действует СТБ ISO 21571-2008.

УДК [664:604.6]:543.61.061(083.74)(476) МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: продукты пищевые, генетически модифицированные организмы (ГМО), реакция ПЦР, праймер, целевая последовательность, гибридизация, амплификации

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 29.09.2010. Подписано в печать 10.11.2010. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная. Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 7,78 Уч.- изд. л. 4,46 Тираж 20 экз. Заказ 1036

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