ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 21571-2016

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ

Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов

Экстрагирование нуклеиновых кислот

ПРАДУКЦЫЯ ХАРЧОВАЯ

Метады аналізу для выяўлення генетычна мадыфікаваных арганізмаў і вытворных прадуктаў

Экстрагаванне нуклеінавых кіслот

(ISO 21571:2005, IDT)

Издание официальное



Госстандарт

Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 664:543.062:547.963.32(083.74)(476) МКС 67.050 КП 03 IDT

Ключевые слова: продукция пищевая, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), генетически модифицированные организмы (ГМО), количественная оценка, валидация

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 23 мая 2016 г. № 37

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21571:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction (Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и их производных. Извлечение нуклеиновой кислоты).

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевой продукции. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN) совместно с техническим комитетом по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевая продукция» Международной организации по стандартизации (ISO) в соответствии с соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венское соглашение).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, и международного стандарта, на который даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международный стандарт актуализированы.

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

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВЗАМЕН СТБ ISO 21571-2008

© Госстандарт, 2016

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Принцип метода 1
3.1 Общие положения 1
3.2 Экстрагирование ДНК 1
3.3 Количественная оценка содержания ДНК 2
4 Общие требования к лаборатории 2
5 Методика 2
5.1 Приготовление пробы для анализа 2
5.2 Экстрагирование и очистка ДНК 3
5.3 Количественная оценка экстрагированной ДНК 5
5.4 Стабильность экстрагированной ДНК 6
6 Оценка результатов 6
7 Протокол испытаний 6
Приложение А (обязательное) Методы экстрагирования ДНК 7
Приложение В (обязательное) Методы количественной оценки экстрагированной ДНК 36
Библиография 42
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам 47

Введение

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

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

– ISO 21570 «Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте».

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКЦИЯ ПИЩЕВАЯ
Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов
Экстрагирование нуклеиновых кислот

ПРАДУКЦЫЯ ХАРЧОВАЯ
Метады аналізу для выяўлення генетычна мадыфікаваных арганізмаў і вытворных прадуктаў
Экстрагаванне нуклеінавых кіслот

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

Дата введения 2017-01-01

1 Область применения

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

Настоящий стандарт разработан для пищевых матриц, но может быть также применен к другим матрицам, например зерновым культурам и кормам.

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

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный стандарт. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

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

3 Принцип метода

3.1 Общие положения

Основной целью применения методов экстрагирования нуклеиновых кислот является обеспечение выделения нуклеиновых кислот, пригодных для последующего анализа (см. ISO 24276).

Примечание – «Качество» ДНК зависит от средней длины экстрагированных молекул ДНК, химической чистоты и структурной целостности одной нити и двойной спирали ДНК (например, внутри- и межцепочечные связи оснований ДНК, выпадение оснований в цепочке ДНК, перекрестные сшивки с высокомолекулярными спиртами, гемином и т. д.). Кроме того, такие структурные изменения часто являются специфичными для определенной последовательности ДНК и поэтому не распределены по геному случайным образом (см. [1]–[4]).

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

3.2 Экстрагирование ДНК

Основной принцип экстрагирования ДНК заключается в выделении ДНК, присутствующей в матрице пробы, а затем одновременной или последующей очистке ДНК от ингибиторов ПЦР.

Издание официальное

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

Альтернативные методы могут применяться при условии, что метод был проверен на соответствующей матрице, подлежащей исследованию.

3.3 Количественная оценка содержания ДНК

Количественная оценка экстрагированной ДНК может потребоваться для последующего анализа ПЦР.

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

Существует несколько методов, применяемых для определения количества ДНК, присутствующей в растворе. Эти методы изложены в приложении В. Выбор наиболее подходящего метода осуществляется пользователем в зависимости от количества и качества ДНК, подлежащей количественному определению, а также от матрицы, из которой была экстрагирована ДНК.

Альтернативные методы могут применяться при условии, что метод был проверен на соответствующей матрице.

4 Общие требования к лаборатории

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

– всех установленных методологических этапов, используемых для получения промежуточных и конечных результатов; и

– принципа «прямого потока» при обращении с пробами.

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

Дополнительные требования к лабораториям приведены в ISO 24276.

5 Методика

5.1 Приготовление пробы для анализа

5.1.1 Общие положения

Специфические параметры анализируемой продукции (например, влажность) и ее обработка могут влиять на количество и качество ДНК, экстрагируемой из анализируемой продукции. В связи с этим рабочие характеристики применяемого метода экстрагирования ДНК зависят от матрицы анализируемой продукции.

Необходимо принять соответствующие меры, чтобы гарантировать, что навеска пробы является представительной лабораторной пробой.

Навеска пробы должна быть достаточного размера (объема, массы) и содержать достаточное количество частиц для обеспечения представительности лабораторной пробы.

Исходя из практических и технических соображений, не рекомендуется, чтобы величина навески пробы превышала 2 г.

Любые ограничения, связанные с размером навески пробы, не позволяющие рассматривать ее как представительную пробу, должны быть учтены при интерпретации аналитических результатов и указаны в протоколе испытаний. Методы экстрагирования ДНК, приведенные в приложении А, устанавливают величину навески пробы от 200 до 500 мг, что обычно является приемлемым для продукции с высоким содержанием ДНК (твердое и дробленое зерно, мука). Однако для матриц некоторой продукции, содержащих очень малые количества ДНК или деградировавшую ДНК, указанная навеска пробы не позволяет экстрагировать достаточное для анализа количество ДНК. В таких случаях размер навески пробы может быть увеличен.

Экстрагирование ДНК должно выполняться не менее чем из двух навесок пробы одной и той же продукции.

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

5.1.2 Пробы

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

Лабораторные пробы должны быть достаточно однородными перед их сокращением и измельчением, перед отбором анализируемой части пробы.

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

В случае приготовления проб с твердыми матрицами, отличающимися затрудненным измельчением, проба должна быть измельчена для уменьшения размера частиц и/или улучшения экстрагируемости ДНК. В таких случаях особое внимание необходимо обратить на размер частиц. Навеска пробы, подвергаемая экстрагированию, должна содержать минимальное количество частиц. Необходимо, чтобы оборудование, предназначенное для дробления и измельчения пробы, было легко моющимся по всей рабочей поверхности и обеспечивало требуемое количество и размер частиц (гранулометрический состав) анализируемой пробы.

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

Для твердой или пастообразной готовой пищевой продукции с высоким содержанием липидов достаточно трудно достичь требуемого размера частиц за один этап измельчения. В таких случаях допускается перед измельчением применять дополнительные процедуры, такие как удаление липидов гексаном после промежуточного измельчения, замораживание или сублимационная сушилка.

Для улучшения измельчения пастообразной или вязкой продукции для некоторых матриц можно использовать одну из следующих обработок:

– нагрев до максимальной температуры 40 °C;

– растворение в соответствующей жидкости, например воде;

– замораживание при температуре минус 20 °C или ниже.

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

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

По возможности необходимо избегать способов размола и измельчения, при которых возникает высокий риск перекрестного загрязнения (например, объединенное использование жидкого азота и ступки, а также использование одной ступки для разных проб). Одним из основных требований является необходимость изолирования любого методологического этапа, производящего пыль, от всех других аналитических этапов и процедур.

В случае присутствия в лабораторной пробе соли, пряностей, сахарной пудры, сахара-песка, специй и/или других веществ, которые могут потенциально оказывать влияние на экстрагирование или дальнейший аналитический этап, должны быть предприняты дополнительные соответствующие процедуры очистки в соответствии с используемым методом (см. приложение А).

Например, в случае приготовления проб сложного состава материал для исследования (матрица) (например, панировочный слой рыбных палочек) может быть отделен от остальной части продукции для экстрагирования ДНК.

5.2 Экстрагирование и очистка ДНК

5.2.1 Общие положения

При разработке методов экстрагирования необходимо учитывать следующие требования.

Качество и количество экстрагируемой нуклеиновой кислоты при использовании заданного метода на заданной матрице пробы должны быть как повторяемыми, так и воспроизводимыми при условии содержания достаточного количества нуклеиновой кислоты в матрице пробы, из которой она была экстрагирована.

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

– полисахариды (пектин, целлюлозу, гемицеллюлозу, крахмал, загустители и т. д.) путем обработки соответствующим ферментом (например, пектиназой, целлюлазой, гемицеллюлазой, α-амилазой) или экстрагирования органическим растворителем (например, гексадецилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ)/хлороформ);

– рибонуклеиновую кислоту (далее – РНК) и/или белки путем соответствующей обработки, например ферментативной обработкой рибонуклеазой и протеиназой соответственно;

– липидные фракции путем, например, ферментативной обработки или использования растворителей (например, н-гексана);

– соли (например, из буферного раствора для экстрагирования и лизиса на стадии осаждения), способные оказывать влияние на последующий анализ.

В частности, в случае приготовления твердых или высушенных проб объем буферного раствора для экстрагирования и лизиса должен быть таким, чтобы гарантировать растворение в нем ДНК.

Примечание 1 – Очистка ДНК может выполняться различными способами, например путем фракционного осаждения с использованием таких растворителей, как фенол, хлороформ, этанол, изопропанол, и/или с использованием адсорбции на твердые матрицы (анионообменную смолу, силикагель или стеклянный гель, диатомовую землю, мембраны и т. д.). Можно объединить несколько принципов очистки ДНК. При необходимости экстрагирование и очистка могут совмещаться путем выполнения на одном и том же этапе.

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

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

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

Пример – Буферный раствор Трис/EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота, EDTA) (буферный раствор ТЕ, 1× или 0,1×) с установленным значением pH 8,0, который используется для перемешивания или разбавления ДНК.

При применении нового метода экстрагирования ДНК или применении одного из методов, описанных в приложении А, для новых объектов потенциальные качество и целостность экстрагированной ДНК с использованием выбранного метода должны быть проверены следующим образом: добавлением в лизирующий буферный раствор известного количества меченой ДНК вместе с объектом, из которого необходимо выделить ДНК. Если оценка нового метода производится на основании использования меченой ДНК, количество (масса) которой известно, или если оценка производится на основе подсчета количества копий определенной последовательности ДНК, необходимо оценить возможную перекрестную реактивность такой ДНК с ДНК, содержащейся в исследуемой матрице.

Примечание 2 – Использование меченой ДНК является наилучшим приближением к реальной ситуации, когда предполагается образование комплекса ДНК данной матрицы с другими компонентами (например, белками). Такой метод также может использоваться для оценки присутствия растворимых и трансдействующих ингибиторов ПЦР в экстрагированной ДНК (см. ISO 24276, ISO 21569 и ISO 21570).

Однако меченая ДНК может привести к ложному представлению о степени извлечения ДНК, так как она может гораздо легче отделяться от матрицы, чем ДНК-мишень.

5.2.2 Процедуры контроля

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

5.2.3 Контроль чистоты ДНК. Внутренний контроль ПЦР

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

5.3 Количественная оценка экстрагированной ДНК

5.3.1 Общие положения

Качество, целостность и количество матрицы нуклеиновой кислоты оказывают влияние на рабочие характеристики аналитического метода и, следовательно, на полученные аналитические результаты. Предел обнаружения конкретного метода может, таким образом, зависеть от количества использованных нуклеиновых кислот. Общее количество ДНК, используемой в ПЦР, должно определяться вместе с общим количеством целевой таксон-специфичной ДНК, которое должно учитываться, поскольку нецелевая таксон-специфичная ДНК может оказывать отрицательное влияние на эффективность ПЦР.

Количественная оценка ДНК помогает при:

– определении эффективности различных протоколов выделения ДНК для определенного вида объектов (повторяемость); и

– измерении концентрации нуклеиновых кислот перед анализом.

5.3.2 Область применения

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

5.3.3 Количественные стандартные образцы

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

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

Используемый референсный материал (национальный или международный стандартный образец) должен обеспечивать прослеживаемость заявленных характеристик по непрерывной цепи сравнения до национального или международного эталона [см. ISO Guide 30].

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

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

Для построения калибровочного графика требуется не менее трех точек, предпочтительно в повторах. Количество стандартного образца ДНК, используемого для каждой точки калибровочного графика, зависит от чувствительности метода и динамического диапазона измерений.

5.4 Стабильность экстрагированной ДНК

Экстрагированная ДНК должна храниться в условиях, которые обеспечивают ее стабильность для проведения последующих анализов.

Следует избегать многократного замораживания и оттаивания растворов ДНК.

6 Оценка результатов

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

Качество выделенных нуклеиновых кислот должно быть удостоверено соответствующим аналитическим методом с регистрацией и оценкой параметров, аналогичных используемым при анализе (например, если выполняемым анализом является ПЦР, качество экстрагированной ДНК должно оцениваться с использованием соответствующих средств контроля ПЦР).

Дополнительные требования для оценки совместимости метода указаны в ISO 21569, ISO 21570 и ISO 24276.

7 Протокол испытаний

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

– описание происхождения проб для анализа и предварительной обработки пробы перед экстрагированием нуклеиновой кислоты;

– размер проб для анализа, используемых для экстрагирования нуклеиновой кислоты;

– используемый метод экстрагирования нуклеиновой кислоты;

– любые нетипичные ситуации, наблюдаемые во время проведения испытаний;

– любая операция, не указанная в методе или рассматриваемая как необязательная, которая может оказать влияние на результаты;

– оценка результатов;

– имя оператора.

Обработка и хранение исходных данных изложены в ISO/IEC 17025 и определяются системой менеджмента качества. Необходимо обеспечить соответствие требованиям, установленным в указанных документах.

Приложение А
(обязательное)

Методы экстрагирования ДНК

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

А.1.1 Основной метод на основе фенола/хлороформа

А.1.1.1 Общие положения

Данный метод (см. [5]) применяется для экстрагирования ДНК из широкой разновидности матриц (см. А.1.1.8).

Фенол обычно подходит для деструкции нуклеазы и денатурации белка.

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

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

А.1.1.2 Статус валидации

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

А.1.1.3 Принцип метода

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

А.1.1.4 Меры предосторожности

Работы с органическими реагентами необходимо выполнять в вытяжном шкафу.

А.1.1.5 Реагенты

А.1.1.5.1 Этанол, объем чистой фракции $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.1.5.2 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH).

А.1.1.5.3 Ацетат калия ($C_2H_3O_2K$).

А.1.1.5.4 Соляная кислота, $c(HCl)$ = 37 %.

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

А.1.1.5.6 Фенол (C_6H_5OH).

А.1.1.5.7 Хлороформ ($CHCl_3$).

А.1.1.5.8 Трис (гидроксиметил)-аминометан (Трис) ($C_4H_{11}NO_3$).

А.1.1.5.9 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двукалиевая соль (K_2EDTA)($C_{10}H_{14}N_2O_8K_2$).

А.1.1.5.10 Гидроксид калия (KOH).

А.1.1.5.11 Хлорид калия (KCl).

А.1.1.5.12 Додецилсульфат натрия (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$).

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

А.1.1.5.14 Рибонуклеаза-А, очищенная от ДНК, выделенная из бычьей поджелудочной железы, приблизительно 50 Kunitz ед./мг (50 000 ед./мг) лиофилизата.

А.1.1.5.15 Насыщенный фенол, pH > 7,8.

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

А.1.1.5.16 Смесь хлороформ-изоамиловый спирт

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

А.1.1.5.17 Смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт

Смешать одну объемную часть насыщенного фенола (А.1.1.5.15) и одну объемную часть смеси хлороформ-изоамиловый спирт (А.1.1.5.16).

А.1.1.5.18 Буферный раствор для экстрагирования/лизиса концентрации компонентов c(Трис) = 0,050 моль/л, $c(K_2EDTA)$ = 0,050 моль/л, массовая концентрация ρ(SDS) = 30 г/л.

Довести pH до 8,0, используя HCl или KOH.

А.1.1.5.19 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,010 моль/л, $c(K_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0, используя HCl или KOH.

А.1.1.5.20 Раствор протеиназы-К, ρ = 20 мг/мл, растворенный в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.1.5.21 Раствор рибонуклеазы-А, ρ = 10 мг/мл лиофилизата.

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

А.1.1.5.22 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.1.5.23 Раствор ацетата калия, $c(C_2H_3O_2K)$ = 3 моль/л.

Довести значение pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Не автоклавировать. При необходимости пропустить через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

А.1.1.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.1.1.6.1 Центрифуга, поддерживающая ускорение не менее 10 000 g.

На некоторых стадиях анализа необходимо использование центрифуги с охлаждением.

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

А.1.1.6.3 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.1.1.6.4 Сублимационная сушилка (при необходимости).

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

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

А.1.1.7 Методика

А.1.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления пробы для анализа из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК. При изменении величины навески пробы требуется соответственно масштабировать массы реагентов и объемы реактивов.

А.1.1.7.2 Методика экстрагирования

Взвесить 0,25 г анализируемой пробы в микропробирку.

Добавить 1,6 мл буферного раствора для экстрагирования/лизиса (А.1.1.5.18) и, в случае необходимости (например, для проб с высоким содержанием белка), 50 мкл раствора протеиназы-К (А.1.1.5.20). Инкубировать при температуре от 60 °С до 70 °С обычно в течение от 30 мин до 2 ч (также возможно инкубирование в течение ночи). Добавить рибонуклеазу-А (А.1.1.5.21) до конечной концентрации 0,1 мкг/мл. Центрифугировать при ускорении 5000 g в течение 30 мин. Извлечь образовавшийся сверху слой (супернатант) и перенести в чистую пробирку. Добавить к нему один объем насыщенного фенола (А.1.1.5.15), затем осторожно и тщательно перемешать. Центрифугировать при ускорении 5000 g в течение 15 мин, извлечь верхнюю водную фазу и перенести в чистую пробирку. Добавить к образовавшемуся верхнему слою один объем фенола-хлороформа-изоамилового спирта (А.1.1.5.17), затем осторожно и тщательно перемешать. Центрифугировать при ускорении 5000 g в течение 15 мин, извлечь водную фазу и перенести в чистую пробирку. В зависимости от состава матрицы

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

пробы данную процедуру повторяют один или несколько раз до тех пор, пока граница раздела фаз не станет четкой.

Добавить к образовавшемуся сверху слою один объем хлороформа-изоамилового спирта (А.1.1.5.16), затем осторожно и тщательно перемешать. Центрифугировать при ускорении 5000 g в течение 10 мин и извлечь верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Повторять до тех пор, пока граница раздела фаз не станет четкой. Смешать образовавшийся сверху слой с 0,1 объема раствора ацетата калия (А.1.1.5.23) и 2,5 объема 96%-ного этанола (А.1.1.5.1), затем тщательно перемешать, перевернув пробирки. Инкубировать в течение по меньшей мере 5 мин в жидком азоте, или 1 ч при температуре минус 80 °С, или в течение ночи при температуре минус 20 °С. Центрифугировать при ускорении 10 000 g (или вплоть до 13 000 g) при температуре 4 °С в течение по меньшей мере 15 мин, затем осторожно слить образовавшийся сверху слой.

Тщательно промыть осадок ДНК в пробирке после центрифугирования двумя объемами 70%-ного раствора этанола (А.1.1.5.22). Центрифугировать при ускорении от 10 000 до 13 000 g при температуре 4 °С в течение 15 мин, затем осторожно слить образовавшийся сверху слой. Эта стадия является особенно важной для удаления осаждающихся солей, которые могут оказать влияние на последующий анализ (например, ПЦР).

Высушить осадок в пробирке после центрифугирования и повторно растворить его в 100 мкл воды или соответствующего буферного раствора, например буферного раствора ТЕ (А.1.1.5.19). Полученный раствор представляет собой основной раствор ДНК. Добавить рибонуклеазу-А (А.1.1.5.21) до конечной концентрации 0,1 мкг/мл.

А.1.1.8 Перечень примеров

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

А.1.2 Метод на основе фенола-хлороформа. Процедура для заквасочных культур колбас, подвергнутых ферментации

А.1.2.1 Общие положения

Этот метод предназначен для выделения общей ДНК, включая бактериальную геномную ДНК, из колбас. Применимость метода для получения ДНК высокого качества, пригодной для специфического обнаружения рекомбинированной ДНК с использованием ПЦР, была продемонстрирована на колбасах, подвергнутых ферментации [6], а также на колбасах, подвергнутых ферментации и термической обработке, так называемых летних колбасах [7]. Кроме того, было показано, что данный метод экстрагирования пригоден для выделения общей ДНК из сливок специально для обнаружения *Staphylo-*

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

coccus aureus в этой пищевой матрице [8]. (Перечень матриц, для которых применим этот метод, приведен в А.1.2.8).

А.1.2.2 Статус валидации

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

А.1.2.3 Принцип метода

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

А.1.2.4 Меры безопасности

Работы с органическими реагентами должны выполняться в вытяжном шкафу.

А.1.2.5 Реагенты

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

А.1.2.5.2 Этанол, $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.2.5.3 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH).

А.1.2.5.4 Соляная кислота, $c(HCl)$ = 37 %.

А.1.2.5.5 Гидроксид натрия (NaOH).

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

А.1.2.5.7 Фенол (C_6H_5OH).

А.1.2.5.8 Хлороформ ($CHCl_3$).

А.1.2.5.9 Трис(гидроксиметил)-аминометан (Трис) ($C_4H_{11}NO_3$).

А.1.2.5.10 Этилендиаминтетрауксусной кислоты двунатриевая соль (Na_2EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

А.1.2.5.11 Додецилсульфат натрия (SDS) ($C_{12}H_{25}O_4SNa$).

А.1.2.5.12 Лизоцим

50 000 ед./мг белка (1 ед. будет давать ΔA_{450} 0,001 в минуту при pH 6,24 и температуре 25 °С, используя суспензию *Micrococcus lysodeikticus* в качестве субстрата, в 2,6 мл реакционной смеси при оптической длине пути 1 см).

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

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

А.1.2.5.15 Ацетат натрия ($C_2H_3O_2Na$).

А.1.2.5.16 Насыщенный фенол.

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

А.1.2.5.17 Смесь хлороформ-изоамиловый спирт

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

А.1.2.5.18 Смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт

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

А.1.2.5.19 Раствор мутанолизина, содержащий 500 ед./мл или 5000 ед./мл мутанолизина, растворенного в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.1.2.5.20 Раствор лизоцима, c = 10 мг/мл, растворенного в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегая многократного замораживания и оттаивания.

А.1.2.5.21 Раствор сахарозы, $c(C_{12}H_{22}O_{11})$ = 400 г/л.

А.1.2.5.22 Буферный раствор А, c(Трис) = 0,020 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,020 моль/л, c(NaCl) = 0,1 моль/л.

Довести значение pH до 8,0, используя HCl или NaOH.

А.1.2.5.23 Буферный раствор для экстрагирования/лизиса, содержащий одну объемную часть буферного раствора А (А.1.2.5.22) и одну объемную часть раствора сахарозы (А.1.2.5.21).

А.1.2.5.24 Раствор SDS, c(SDS) = 250 г/л.

А.1.2.5.25 Раствор протеиназы-К, c = 20 мг/мл.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.2.5.26 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.2.5.27 Раствор ацетата натрия, $c(C_2H_3O_2Na)$ = 3 моль/л.

Довести значение pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой.

А.1.2.5.28 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,010 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0, используя HCl или NaOH.

А.1.2.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

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

А.1.2.6.2 Центрифуга, поддерживающая ускорение как минимум 12 000 g.

На некоторых стадиях анализа необходимо использовать центрифугу с охлаждением.

А.1.2.6.3 Водяная баня или инкубатор.

А.1.2.6.4 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.1.2.6.5 Смеситель, например Vortex [1)].

А.1.2.7 Методика

А.1.2.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления навески пробы из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК.

При изменении величины навески пробы требуется соответственно масштабировать массу реагентов и объем реактивов.

А.1.2.7.2 Приготовление пробы

Измельчить колбасу, гомогенизировать и добавить к 200–500 мг гомогенизата три объема воды (до 1,5 мл). Выдержать при комнатной температуре приблизительно 10 мин.

А.1.2.7.3 Методика экстрагирования

Осторожно перенести 500 мкл водной фазы (суспензии) в новую пробирку. Центрифугировать в течение 10 мин при ускорении 12 000 g.

Отбросить образовавшийся сверху слой и повторно растворить осадок после центрифугирования в 500 мкл буферного раствора для экстрагирования/лизиса (А.1.2.5.23).

Добавить 50 мкл раствора лизоцима (А.1.2.5.20). Инкубировать при температуре 37 °С в течение 1 ч. Если результаты неудовлетворительные, можно добавить к лизоциму 10 единиц мутанолизина (А.1.2.5.19). Однако перед повседневным применением необходимо проверить специфичное для матрицы воздействие этой добавки.

Добавить 25 мкл раствора SDS (А.1.2.5.24) и 25 мкл раствора протеиназы-К (А.1.2.5.25), затем инкубировать в течение 10 мин при температуре 60 °С.

Добавить один объем фенола-хлороформа-изоамилового спирта (А.1.2.5.18) и перемешать.

Центрифугировать смесь в течение 3 мин при ускорении приблизительно 12 000 g. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку.

Добавить один объем хлороформа-изоамилового спирта (А.1.2.5.17) и перемешать.

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

Центрифугировать смесь в течение 3 мин при ускорении приблизительно 12 000 g. Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.

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

Выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин. Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении приблизительно 12 000 g. Декантировать образовавшийся сверху слой и отбросить его.

Тщательно промыть осадок после центрифугирования не менее 500 мкл раствора этанола (А.1.2.5.26), осторожно встряхивая или перемешивая. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при ускорении приблизительно 12 000 g. Эта стадия является особенно важной для удаления осаждающихся солей, которые могут оказать влияние на последующий анализ (например, ПЦР).

Отбросить образовавшийся сверху слой.

Высушить осадок после центрифугирования и повторно растворить его в 100 мкл воды или соответствующего буферного раствора, например буферного раствора ТЕ (А.1.2.5.28). Полученный раствор представляет собой основной раствор ДНК.

А.1.2.8 Перечень примеров

См. таблицу А.1.

Таблица А.1 – Перечень матриц, к которым был успешно применен данный метод

Успешно проанализированные матрицы	Микроорганизм	Ссылка
Колбаса, подвергнутая ферментации	*Lactobacillus curvatus*	[6]
Летняя колбаса (термообработанная)	*Lactobacillus curvatus*	[7]
Сливки	*Staphylococcus aureus*	[8]

А.1.2.9 Валидация

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

При проведении этого исследования две пробы дали ошибочные положительные результаты, вызванные, возможно, недостатками упаковки. Для данного исследования мутанолизин не использовался.

Таблица А.2 – Данные по валидации

Количество участвующих лабораторий	Количество проб колбасы на лабораторию	Общее количество проб	Количество правильно идентифицированных проб
15	10	150	148 (контрольные пробы и пробы ГМО)

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

А.1.3.1 Общие положения

Этот метод описывает методику экстрагирования основной массы ДНК из заквасочных культур, используемых для ферментации йогурта из молочной продукции. Эта методика успешно применяется для обычных йогуртов, включая йогурты, содержащие различные ингредиенты, такие как фрукты, добавки и стабилизаторы, а также для продукции с различным содержанием жира (см. А.1.3.8 и [9], [10], [11]). Из йогуртов, подвергнутых термической обработке [12], также экстрагируется ДНК, применимая для ПЦР.

А.1.3.2 Статус валидации

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

А.1.3.3 Принцип метода

Этот метод основывается на методике экстрагирования фенолом-хлороформом, которая адаптирована к специальной пищевой матрице (составу) пробы. Грамм-положительные заквасочные культуры йогуртов концентрируются после расщепления коагулированного казеина при щелочном pH. Выделенные клетки повторно суспендируют в буферном водном растворе и обрабатывают лизоцимом (и мутанолизином) для расщепления клеточных оболочек. Лизис клеток происходит при добавлении ионного детергента, такого как додецилсульфат натрия (SDS). Белки удаляют путем обработки протеиназой-К, а затем выполняют экстрагирование смесью фенол-хлороформ и хлороформом в несколько стадий. Последней стадией является осаждение ДНК этанолом.

А.1.3.4 Меры безопасности

Работы с органическими реагентами должны выполняться в вытяжном шкафу.

А.1.3.5 Реагенты

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

А.1.3.5.2 Этанол, $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.

Хранить и пользовать при температуре минус 20 °С.

А.1.3.5.3 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH).

А.1.3.5.4 Хлорид натрия (NaCl).

А.1.3.5.5 Цитрат натрия ($C_6H_5Na_3O_7$).

А.1.3.5.6 Соляная кислота, c(HCl) = 37 %.

А.1.3.5.7 Гидроксид натрия (NaOH).

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

А.1.3.5.9 Фенол (C_6H_5OH).

А.1.3.5.10 Хлороформ ($CHCl_3$).

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

А.1.3.5.12 Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Na2EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

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

А.1.3.5.14 Лизоцим, 50 000 ед./мг белка (1 ед. будет давать ΔA_{450} 0,001 в минуту при pH 6,24 и температуре 25 °С, используя суспензию *Micrococcus lysodeikticus* в качестве субстрата, в 2,6 мл реакционной смеси при оптической длине пути 1 см).

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

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

А.1.3.5.17 Ацетат натрия ($C_2H_3O_2Na$).

А.1.3.5.18 Раствор цитрата натрия, $\rho(C_6H_5Na_3O_7)$ = 400 г/л.

А.1.3.5.19 Раствор гидроксида натрия, c(NaOH) = 0,4 моль/л.

Растворить в стерильной воде. Не автоклавировать. Перед использованием готовить свежий раствор.

А.1.3.5.20 Раствор хлорида натрия/цитрата натрия (SSC 5x, концентрированный 5-кратный основной раствор), c(NaCl) = 0,75 моль/л, $c(C_6H_5Na_3O_7)$ = 0,075 моль/л.

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

А.1.3.5.21 Насыщенный фенол

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

А.1.3.5.22 Смесь хлороформ-изоамиловый спирт

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

А.1.3.5.23 Смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт

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

А.1.3.5.24 Раствор мутанолизина, содержащий 500 или 5000 ед./мл мутанолизина, растворенного в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.3.5.25 Раствор лизоцима, содержащий 10 мг/мл лизоцима, растворенного в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.3.5.26 Раствор сахарозы, $c(C_{12}H_{22}O_{11})$ = 400 г/л.

А.1.3.5.27 Буферный раствор А, c(Трис) = 0,020 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,020 моль/л, c(NaCl) = 0,100 моль/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

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

А.1.3.5.29 Раствор SDS, ρ(SDS) = 250 г/л.

А.1.3.5.30 Раствор протеиназы-К, c = 20 мг/мл, растворенной в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.1.3.5.31 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.3.5.32 Раствор ацетата натрия, $c(C_2H_3O_2Na)$ = 3 моль/л.

Доводят значение pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой.

А.1.3.5.33 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,010 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.1.3.6 Оборудование

Применяется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.1.3.6.1 Центрифуга, поддерживающая ускорение не менее 12 000 g. На некоторых стадиях анализа необходимо использование центрифуги с охлаждением.

А.1.3.6.2 Водяная баня или инкубатор.

А.1.3.6.3 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.1.3.6.4 Смеситель, например Vortex [1)].

А.1.3.7 Методика

А.1.3.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления навески пробы из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК. При изменении размера пробы для анализа требуется соответственно масштабировать массы реагентов и объемы реактивов.

А.1.3.7.2 Методика экстрагирования

Хорошо встряхнуть или перемешать йогурт. Перенести 250 мкл йогурта в пробирку вместимостью 2 мл. Добавить 80 мкл раствора цитрата натрия (А.1.3.5.18). Добавить 150 мкл раствора NaOH (А.1.3.5.19) и хорошо перемешать. Центрифугировать при ускорении 12 000 g в течение 2 мин.

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

Отбросить верхний слой жира и образовавшийся сверху водный слой и повторно суспендировать осадок после центрифугирования в 500 мкл раствора 5x SSC (А.1.3.5.20). Центрифугировать не менее 2 мин при ускорении около 12 000 g. Отбросить образовавшийся сверху слой. Повторно суспендировать осадок после центрифугирования в 500 мкл раствора 5x SSC. Центрифугировать в течение 2 мин при ускорении около 12 000 g. Отбросить образовавшийся сверху слой.

Повторно суспендировать осадок после центрифугирования в 500 мкл буферного раствора для экстрагирования/лизиса (А.1.3.5.28). Добавить 50 мкл раствора лизоцима (А.1.3.5.25). Инкубировать при температуре 37 °С в течение 1 ч. Если результаты неудовлетворительные, к лизоциму может быть добавлено 10 ед. мутанолизина (А.1.3.5.24). Однако перед повседневным применением необходимо проверить специфичное для матрицы воздействие этой добавки.

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

Добавить 25 мкл раствора SDS (А.1.3.5.29) и 25 мкл раствора протеиназы-К (А.1.3.5.30). Инкубировать в течение 10 мин при температуре 60 °С. Добавить 500 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (А.1.3.5.23) и перемешать. Центрифугировать в течение 3 мин при ускорении около 12 000 g. Перенести верхнюю водную фазу в новую пробирку. Добавить один объем хлороформа-изоамилового спирта (А.1.3.5.22) и перемешать. Центрифугировать в течение 3 мин при ускорении около 12 000 g.

Перенести верхнюю фазу в новую пробирку. Добавить 0,1 объема раствора ацетата натрия (А.1.3.5.32) и один объем изопропанола (А.1.3.5.1). Выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин. Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении около 12 000 g. Отбросить образовавшийся сверху слой. Тщательно промыть осадок после центрифугирования не менее 500 мкл раствора этанола (А.1.3.5.31). Центрифугировать смесь в течение 10 мин при ускорении около 12 000 g. Эта стадия является очень важной для удаления осаждающихся солей, которые могут оказывать влияние на последующий анализ (например, ингибирование ПЦР). Отбросить образовавшийся сверху слой.

Высушить осадок после центрифугирования и повторно растворить его в 100 мкл воды или соответствующего буферного раствора, например буферного раствора ТЕ (А.1.3.5.33). Полученный раствор представляет собой основной раствор ДНК.

А.1.3.8 Перечень примеров

См. таблицу А.3.

Таблица А.3 – Перечень матриц, к которым был успешно применен указанный метод

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

А.1.3.9 Валидация

Данные по валидации, приведенные в таблице А.4, были получены в результате совместного исследования, выполненного рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевой продукции, полученной с использованием способов генной инженерии» Комиссии Федерального управления по охране здоровья Германии для внедрения методов согласно статье 35 закона Германии о пищевой продукции [11].

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

Таблица А.4 – Данные по валидации

Количество участвующих лабораторий	Количество проб йогурта на лабораторию	Общее количество проб	Количество правильно идентифицированных проб
20	10	200	200 (99 контрольных проб и 101 проба ГМО)

А.1.4 Метод на основе фенола-хлороформа. Процедура для дрожжей и/или гифомицетов, собранных из пищевой продукции

А.1.4.1 Общие положения

Данный метод описывает одноступенчатое экстрагирование и очистку ДНК, пригодной для ПЦР, из дрожжей, гифомицетов [13] или выделенных микробных популяций. Метод применим для экстрагирования ДНК из генетически модифицированных микроорганизмов в пробах с очень сложной матрицей [14], [15]. Метод может использоваться для экстрагирования общей ДНК из матриц [14], [15] или микробной фракции, которая непосредственно выделена из матрицы либо собрана из заквасочных культур (колонии на жидких или агаровых средах).

Примечание – Предварительное выделение микробной фракции из пробы для анализа дает наиболее достоверные результаты при экстрагировании ДНК.

Общую ДНК из матрицы пробы допускается экстрагировать с помощью альтернативных методов, приведенных в приложении А. Однако эти методы не гарантируют, что достаточное количество ДНК будет выделено из всех микроорганизмов (особенно из грибов, устойчивых к лизису, или грамотрицательных бактерий). Данный метод может использоваться для экстрагирования общей ДНК из таких матриц, как йогурт, молоко или сыр. Однако было показано, что достоверное экстрагирование хорошо обеспечивается только для тонкоизмельченных или размолотых твердых матриц. В силу этого перед применением метода его эффективность необходимо всегда проверять на основной матрице исследуемой пробы.

А.1.4.2 Статус валидации

Этот метод экстрагирования ДНК был применен и проверен [13] на 25 родах грибов, представляющих 325 видов (включая дрожжи, используемые в хлебопекарном производстве или виноделии, и Penicillia spp. [16], используемые производителями голубого сыра), в форме мицелия и спор (среди которых виды, наиболее устойчивые к разрыву или лизису, например Aspergillus fumigatus и Cryptococcus neoformans). Данный метод был разработан таким образом, чтобы избежать лабораторного загрязнения и загрязнения между пробами. Такое свойство метода позволяет применять его для проведения повседневных экстрагирований ДНК и ПЦР в больших объемах. При применении метода не было обнаружено изменений качества матрицы при качественной ПЦР после долгосрочного хранения при температуре минус 20 °С в течение 5 лет или между различными препаратами ДНК из одного и того же организма. Несмотря на то, что качество экстрагированной данным методом ДНК подходит для качественной ПЦР, она может подвергаться недостаточному расщеплению в процессе рестрикционного анализа. Однако для использования ДНК, экстрагированной данным методом, для количественной ПЦР необходимо выполнить процедуру ее дополнительной очистки с использованием другого метода, например такого, который описан в А.4.

А.1.4.3 Принцип метода

В основном бактерии, дрожжи или мицелий разрушаются, и ДНК одновременно экстрагируется при перемешивании с высокой скоростью в присутствии стеклянных шариков в смеси Трис-фенол-хлороформ-ЭДТА-SDS, а затем осаждается этанолом.

А.1.4.4 Меры безопасности

Работы с органическими реагентами необходимо выполнять в вытяжном шкафу.

А.1.4.5 Реагенты

А.1.4.5.1 Этанол, $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.
Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.
А.1.4.5.2 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH).
А.1.4.5.3 Серная кислота, $c(H_2SO_4)$ > 90 %.
А.1.4.5.4 Бикарбонат калия ($KHCO_3$).
А.1.4.5.5 Ацетат калия ($C_2H_3O_2K$).
А.1.4.5.6 Соляная кислота, $c(HCl)$ = 37 %.
А.1.4.5.7 Изоамиловый спирт [$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$].
А.1.4.5.8 Фенол (C_6H_5OH).
А.1.4.5.9 Хлороформ ($CHCl_3$).
А.1.4.5.10 Трис(оксиметил)-аминометан (Трис) ($C_4H_{11}NO_3$).
А.1.4.5.11 Этилендиаминтетрауксусная кислота, дикалиевая соль (K_2EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8K_2$).
А.1.4.5.12 Гидроксид калия (KOH).

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

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

А.1.4.5.15 Насыщенный фенол, pH > 7,8.

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

А.1.4.5.16 Смесь хлороформ-изоамиловый спирт

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

А.1.4.5.17 Смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт

Смешать одну объемную часть насыщенного фенола (А.1.4.5.15) с одной объемной частью хлороформа-изоамилового спирта (А.1.4.5.16).

А.1.4.5.18 Буферный раствор для экстрагирования/лизиса, c(Трис) = 0,050 моль/л, $c(K_2EDTA)$ = 0,050 моль/л, c(SDS) = 30 г/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или KOH.

А.1.4.5.19 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,010 моль/л, $c(K_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или KOH.

А.1.4.5.20 Раствор рибонуклеазы-А, ρ(RNase-A) = 10 мг/мл лиофилизата.

Хранить при температуре минус 20 °С.

А.1.4.5.21 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.1.4.5.22 Раствор ацетата калия, $c(C_2H_3O_2K)$ = 3 моль/л.

Довести значение pH до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Не автоклавировать. При необходимости пропускают через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

А.1.4.5.23 Кондиционированные стеклянные шарики

Стеклянные шарики диаметром 0,2–0,5 мм выдержать в течение ночи в концентрированной H_2SO_4 (А.1.4.5.3). Промыть их стерильной водой, прокипятить в растворе $KHCO_3$ (А.1.4.5.24), снова промыть стерильной водой и высушить при температуре 80 °С в вакууме [13], [14].

А.1.4.5.24 Раствор бикарбоната калия, $\rho(KHCO_3)$ = 50 г/л.

Использовать свежеприготовленный водный раствор.

А.1.4.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.1.4.6.1 Встряхиватель для полиэтиленовых микропробирок вместимостью 2 мл с навинчивающимися колпачками. Скорость встряхивания – не менее 100 встряхиваний/мин (например, Mini-BeadBeaterTM [1)]).

А.1.4.6.2 Микропробирки, полиэтиленовые пробирки вместимостью 2 мл с кольцевым уплотнением и навинчивающимися колпачками.

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

А.1.4.6.4 Центрифуга, способная удерживать микропробирки вместимостью 2 мл при ускорении как минимум 10 000 g.

На некоторых стадиях анализа необходимо использование центрифуги с охлаждением.

А.1.4.6.5 Водяная баня или инкубатор.

А.1.4.6.6 Вакуумная сушилка (при необходимости).

Рекомендуется для приготовления стеклянных шариков (А.1.4.5.23).

А.1.4.6.7 Смеситель, например Vortex [2)].

[1)] Mini-BeadBeater – пример подходящего оборудования, имеющегося в продаже из Biospec-оборудования. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не предполагает неукоснительное применение. Может использоваться эквивалентное по параметрам оборудование, если его применение приводит к тем же результатам.

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

А.1.4.7 Методика

А.1.4.7.1 Приготовление навески пробы и микробной фракции

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

Исходя из навески пробы объемом 1–2 мл, выделить микробиологическую популяцию соответствующим образом (см. А.1.3). В качестве альтернативы дрожжи или гифомицеты, выделенные из навески пробы, могут культивироваться как заквасочные культуры. В обоих случаях микроорганизмы собираются и подвергаются дальнейшей обработке в соответствии с А.1.4.7.2 или хранятся при температуре минус 20 °С до начала обработки.

А.1.4.7.2 Экстрагирование ДНК

А.1.4.7.2.1 Мицелий, собранный на фильтре из стекловолокна, дважды промывают буферным раствором для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18), не содержащим SDS. Снимают мицелиальную пленку с фильтра и переносят ее в микропробирку вместимостью 2 мл с навинчивающимся колпачком (А.1.4.6.2), содержащую (наполовину пробирки) кондиционированные стеклянные шарики (А.1.4.5.23), 600 мкл буферного раствора для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18) и 600 мкл смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (А.1.4.5.17). Дальнейшая обработка описана в А.1.4.7.2.3.

А.1.4.7.2.2 С осадками после центрифугирования либо общей микробной популяции бактерий, мицелия, дрожжей либо дрожжеподобных микроорганизмов необходимо выполнить следующие процедуры. Промыть клетки один раз 1 мл буферного раствора для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18), не содержащего SDS, центрифугировать при ускорении от 10 000 до 13 000 g в течение 10 мин, повторить по меньшей мере еще один раз, затем повторно растворить в 600 мкл буферного раствора для экстрагирования/лизиса (А.1.4.5.18) и перенести в микропробирку, содержащую стеклянные шарики и смесь фенол-хлороформ, как указано в А.1.4.7.2.1.

А.1.4.7.2.3 После стадии А.1.4.7.2.1 или А.1.4.7.2.2 перемешать микропробирку на встряхивателе (А.1.4.6.1) со скоростью не менее 100 встряхиваний/мин в течение 1–2 мин, затем немедленно инкубировать при температуре 65 °С в течение 30–120 мин. Центрифугировать при ускорении от 10 000 до 13 000 g в течение 10 мин. Перенести образовавшийся сверху слой в новую микропробирку.

В случае выбора ДНК для дальнейшей количественной ПЦР необходимо выполнить следующие процедуры. После 30 мин инкубирования центрифугировать при ускорении от 10 000 до 13 000 g в течение 15 мин. Перенести образовавшийся сверху слой в новую микропробирку, добавить рибонуклеазу-А (А.1.4.5.20) до конечной концентрации 0,001 мг/мл и инкубировать еще в течение 30–90 мин при температуре 65 °С.

Добавить раствор ацетата калия (А.1.4.5.22) до конечной концентрации 0,3 моль/л. Перемешать, добавить 1,2 мл этанола (А.1.4.5.1) и инкубировать в течение ночи при температуре минус 20 °С или в течение 1 ч при температуре минус 80 °С. Осадить ДНК путем центрифугирования при ускорении от 10 000 до 13 000 g в течение 15 мин при температуре 4 °С.

После центрифугирования осторожно промыть осадок ДНК раствором этанола (А.1.4.5.21). Слить образовавшийся сверху слой на бумагу и высушить микропробирку в вакууме. Растворить ДНК в 50–100 мкл воды. Допускается длительное (до 5 лет) хранение при температуре минус 20 °С. На основании проведенных проверок [13] допускается использование воды вместо буферного раствора ТЕ (А.1.4.5.19). Полученный раствор является основным раствором ДНК.

А.1.4.8 Перечень примеров

Количество исследованных видов/штаммов указывается в скобках:

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

А.1.4.9 Валидация

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

А.2 Получение ДНК, применимой для ПЦР, методами экстрагирования ДНК на основе ПВП

А.2.1 Основной метод на основе ПВП

А.2.1.1 Общие положения

Этот простой, быстрый и дешевый метод [19] пригоден для широкого диапазона матриц, особенно содержащих большие количества полифенольных соединений.

А.2.1.2 Статус валидации

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

А.2.1.3 Принцип

Метод включает стадию лизиса (термический лизис в присутствии додецилсульфата натрия и EDTA высокой концентрации) и последующее удаление из водной фазы, содержащей ДНК, загрязняющих примесей, например, полифенольных молекул, полисахаридов, метаболитов и растворимых белков, с помощью ПВП в комбинации с ацетатом аммония. Выполнение заключительного осаждения ДНК спиртом концентрирует ДНК и очищает ее от солей (см. [19]–[23]).

А.2.1.4 Меры безопасности

Все работы с органическими реагентами необходимо выполнять в вытяжном шкафу.

А.2.1.5 Реагенты

А.2.1.5.1 Этанол, $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.2.1.5.2 Изопропанол ($CH_3CHOHCH_3$).

А.2.1.5.3 Поливинилпирролидон (ПВП), молекулярная масса M = 360 000 D; характеристическая вязкость (значение K) = 80–100 [1)].

А.2.1.5.4 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH).

А.2.1.5.5 Соляная кислота, c(HCl) = 37 %.

А.2.1.5.6 Хлорид натрия (NaCl).

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

А.2.1.5.8 Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Na_2EDTA).

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

А.2.1.5.10 Ацетат аммония ($C_2H_3O_2NH_4$).

А.2.1.5.11 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

Хранить и использовать при температуре минус 20 °С.

А.2.1.5.12 Буферный раствор для экстрагирования, pH 8,0, c(Трис) = 0,2 моль/л, c(NaCl) = 0,250 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,025 моль/л, ρ(SDS) = 50 г/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.2.1.5.13 Раствор ацетата аммония, $c(NH_4C_2H_3O_2)$ = 7,5 моль/л.

Растворить в стерильной воде и, насколько возможно, стерилизовать путем пропускания через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

А.2.1.5.14 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,010 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.2.1.6 Оборудование

Необходимо использовать обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.2.1.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение 10 000 g.

На некоторых этапах необходимо использование центрифуги с охлаждением.

А.2.1.6.2 Водяная баня или инкубатор.

А.2.1.6.3 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.2.1.6.4 Сублимационная сушилка (при необходимости).

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

А.2.1.6.5 Смеситель, например Vortex [1].

А.2.1.7 Методика

А.2.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления пробы для анализа из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК. При изменении величины навески пробы требуется соответственно масштабировать массы реагентов и объемы реактивов.

А.2.1.7.2 Методика экстрагирования

Взвесить 0,25 г измельченного или жидкого материала в пробирку. Добавить 1 мл буферного раствора для экстрагирования (А.2.1.5.12). Перемешивать суспензию при температуре 65 °С в течение 1 ч, охладить до комнатной температуры. Последовательно смешать суспензию с 60 мг порошка ПВП (А.2.1.5.3) и 0,5 объема раствора ацетата аммония (А.2.1.5.13). Инкубировать на льду в течение 30 мин.

Центрифугировать при ускорении 10 000 g в течение 10 мин и перенести образовавшийся сверху слой в чистую пробирку. Смешать лизат с одним объемом изопропанола (А.2.1.5.2) и инкубировать при температуре минус 20 °С в течение 30 мин. Центрифугировать при ускорении 10 000 g и температуре 4 °С в течение 10 мин и осторожно отбросить образовавшийся сверху слой.

Промыть осадок ДНК в пробирке после центрифугирования двумя объемами раствора этанола (А.2.1.5.11). Этот этап является важным для удаления любых солей, которые могут оказывать влияние на последующий анализ (например, ингибирование ПЦР). Осторожно отбросить образовавшийся сверху слой (в случае рыхлого осадка центрифугировать при ускорении 10 000 g и температуре 4 °С в течение 10 мин). Высушить осадок и повторно растворить его в 100 мкл воды или соответствующего буферного раствора, например буферного раствора ТЕ (А.2.1.5.14). Этот раствор является основным раствором ДНК.

А.2.1.8 Перечень примеров

Метод был успешно применен для экстрагирования ДНК [2] из следующих матриц: детское печенье [1], детское молоко [1], бельгийский паштет, панировка (пшеничная или кукурузная) из рыбных палочек, шоколадное пирожное с орехами [1], консервированная кукуруза, брикетированный зерновой концентрат [1], сырный крокет, куриные наггетсы, курица, печенье, глазированное шоколадом [1], шоколадная паста [1], кукурузные хлопья [1], хрустящие овощи, десертный крем [1], композиции для вскармливания детей, кукурузное печенье [1], кукурузная мука, мясо свежее и подвергнутое тепловой обработке (говядина, свинина, курица и индейка), рубленое мясо, мюсли [1], воздушная кукуруза, сухое молоко, колбаса (реализуемая в ломтиках [1] и коктейльные сосиски [1]), шницель, побеги сои [1], суповые шарики, соевый белок в мясных препаратах [1], соевый лецитин [1], соевые напитки [1], соевый крем, соус для спагетти [1], speculoos, соевый творог, вегетарианский рубленый шницель, вафли с шоколадом [1], вафли [1], йогурт [1].

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

А.3.1 Основной метод на основе ЦТАБ

А.3.1.1 Общие положения

Этот метод применим для экстрагирования ДНК из растений и из матриц, полученных из растений, в силу его особой способности удалять полисахариды и полифенольные соединения, которые

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

[2] Повторяемость может зависеть от партии матрицы и/или технологии ее получения. В некоторых случаях ДНК не может быть обнаружена, или она подверглась расщеплению таким образом, что результаты ПЦР ниже предела обнаружения метода независимо от используемых затравок/протоколов ПЦР. Это может быть источником низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

могут оказывать негативное влияние на качество экстрагируемой ДНК. Метод также пригоден и для некоторых других матриц (см. А.3.1.8).

А.3.1.2 Статус валидации

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

Этот метод широко используется во многих лабораториях для повседневного экстрагирования ДНК.

А.3.1.3 Принцип

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

Для некоторых матриц рекомендуется выполнить различные стадии с использованием ферментов, как указано в А.3.1.7. α-амилаза добавляется к буферному раствору для лизиса, чтобы дигерировать крахмалы в случае амилазных матриц. Для большинства матриц необходима обработка проб протеиназой-К для удаления белков. Как правило, рекомендуется обработка рибонуклеазой тех матриц, для которых соосаждение рибонуклеиновой кислоты может создавать трудности для последующего анализа.

Концентрация солей во время проведения стадий экстрагирования – важный параметр для удаления загрязняющих примесей. В случае понижения концентрации солей ниже 0,5 моль/л при комнатной температуре и/или снижения температуры ниже 16 °С будет образовываться осадок ЦТАБ-нуклеиновая кислота. Увеличением концентрации солей (например, при добавлении хлорида натрия) можно добиться очистки от денатурированных белков и полисахаридов, образующих комплексные соединения с ЦТАБ, в то время как нуклеиновые кислоты становятся растворимыми. Хлороформ используется для дальнейшей очистки нуклеиновых кислот от ЦТАБ и комплексов полисахарид – белок.

А.1.1.1 Окончательно нуклеиновые кислоты очищают путем осаждения изопропанолом и промывки этанолом.

А.3.1.4 Меры безопасности

Все работы с органическими реагентами должны выполняться в вытяжном шкафу.

А.3.1.5 Реагенты

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

А.3.1.5.2 Хлороформ ($CHCl_3$).

А.3.1.5.3 Этанол, $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.

А.3.1.5.4 Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Na2-EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

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

А.3.1.5.6 Соляная кислота, c(HCl) = 37 %.

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

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

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

А.3.1.5.10 Хлорид натрия (NaCl).

А.3.1.5.11 Гидроксид натрия (NaOH).

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

А.3.1.5.13 Раствор α-амилазы (при необходимости), c(α-амилаза) = 10 мг/мл.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.3.1.5.14 Буферный раствор ЦТАБ для экстрагирования, ρ(ЦТАБ) = 20 г/л, c(NaCl) = 1,4 моль/л, c(Трис) = 0,1 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,02 моль/л.

Доводят значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.3.1.5.15 Буферный раствор ЦТАБ для осаждения, ρ(ЦТАБ) = 5 г/л, c(NaCl) = 0,04 моль/л.

А.3.1.5.16 Раствор хлорида натрия, c(NaCl) = 1,2 моль/л.

А.3.1.5.17 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

А.3.1.5.18 Раствор протеиназы-К (при необходимости), ρ = 20 мг/мл, растворен в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.3.1.5.19 Раствор рибонуклеазы-А (при необходимости), ρ = 10 мг/мл.

Хранить в аликвотах при температуре минус 20 °С.

А.3.1.5.20 Буферный раствор ТЕ, *c*(Трис) = 0,01 моль/л, *c*(Na_2-EDTA) = 0,001 моль/л. Доводят значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.3.1.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

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

А.3.1.6.2 Центрифуга, например микроцентрифуга, обеспечивающая ускорения 12 000 g. На некоторых стадиях анализа необходимо использование центрифуги с охлаждением.

А.3.1.6.3 Смеситель, например Vortex [1)].

А.3.1.6.4 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.3.1.7 Методика

А.3.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления навески пробы из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК. При изменении размера пробы для анализа требуется соответственно масштабировать массы реагентов и объемы реактивов.

А.3.1.7.2 Экстрагирование пробы

Взвесить 200–300 мг испытуемой пробы в пробирку.

Добавить 1,5 мл предварительно нагретого до 65 °С буферного раствора ЦТАБ для экстрагирования (А.3.1.5.14) и перемешать. (В некоторых случаях может потребоваться большее количество буферного раствора для растворения матрицы). Добавить 10 мкл раствора α-амилазы (А.3.1.5.13, при необходимости), 10 мкл раствора рибонуклеазы-А (А.3.1.5.19, при необходимости) и осторожно перемешать. Инкубировать в течение 30 мин при температуре 65 °С при перемешивании. Добавить 10 мкл раствора протеиназы-К (А.3.1.5.18, при необходимости), аккуратно перемешать пробирку и инкубировать в течение 30 мин при температуре 65 °С при перемешивании (при необходимости). Центрифугировать в течение 10 мин при ускорении около 12 000 g. Перенести образовавшийся сверху слой в новую пробирку, добавить 0,7–1 объем хлороформа (А.3.1.5.2) и тщательно перемешать.

Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении около 12 000 g. Перенести верхнюю (водную) фазу в новую пробирку.

А.3.1.7.3 ЦТАБ-осаждение

Добавить два объема буферного раствора ЦТАБ для осаждения (А.3.1.5.15). Инкубировать в течение 60 мин при комнатной температуре без перемешивания. Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении 12 000 g. Отбросить образовавшийся сверху слой. Растворить осажденную ДНК 350 мкл раствора NaCl (А.3.1.5.16). Добавить 350 мкл хлороформа (А.3.1.5.2) и тщательно перемешать. Центрифугировать в течение 10 мин при ускорении 12 000 g. Перенести водную фазу в новую пробирку.

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

А.3.1.7.4 Осаждение ДНК

Добавить 0,6 объема изопропанола (А.3.1.5.7), осторожно перемешать путем переворачивания пробирки и выдержать ее при комнатной температуре в течение 20 мин. Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении 12 000 g. Отбросить образовавшийся сверху слой. Добавить 500 мкл раствора этанола (А.3.1.5.17) в пробирку и перемешать, переворачивая ее несколько раз. Эта стадия является важной для обеспечения полного удаления ЦТАБ. Центрифугировать в течение 10 мин при ускорении 12 000 g. Отбросить образовавшийся сверху слой. Высушить осадок ДНК в пробирке после центрифугирования и повторно растворить его в 100 мкл воды или соответствующего буферного раствора, например буферного раствора ТЕ (А.3.1.5.20). Полученный раствор представляет собой основной раствор ДНК.

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

А.3.1.8 Перечень примеров

Метод был успешно применен для экстрагирования ДНК [1)] из следующих матриц: продукция детского питания (порошкообразные), продукция детского питания, смеси для хлебопекарного производства, сухое печенье, бульонные кубики [2)], сладкие и кислые конфеты, консервированная кукуруза, крем-брюле [1)], кормовой жмых, зерно хлебных злаков (рис, пшеница, овес, рожь, гречиха, просо), плиточный шоколад [1)], шоколадный крем [1)], шоколадные конфеты [1)], печенье, глазированное шоколадом [1)], печенье, кукурузное пиво [1)], кукурузные хлопья [1)], десертный крем, декстроза [1)], начинка массы пралине, мелкие мучные кондитерские изделия, рыба [1)], рыбные палочки [1)], хлопья из цельной сои, замороженный картофель, жаренный кусочками, подливка из сока жареного мяса [1)], вареный окорок, мед [1)], кормовая мука быстрого приготовления, кукурузные початки, кукурузная мука, зародыши кукурузы [1)], кукурузный глютеновый корм, листья кукурузы, кукурузный нативный крахмал [1)], кукурузное масло (нативное) [1)], белки из кукурузы [1)], семена/зерна кукурузы, крупка из кукурузы, маргарин [1)], свежее мясо, сухое молоко, молоко, комбикорм для домашних животных, мюсли [1)], семена золотистой фасоли, листья горчицы, воздушная кукуруза (необработанная), хрустящий картофель, картофельный крахмал (нативный), клубни картофеля, листья рапса, рапсовый жмых, рапсовое масло (нерафинированное/нативное) [1)], семена рапса, необработанный соевый лецитин [1)], кормовая мука, готовая к употреблению, салями (с высоким содержанием жира), соленый сухой завтрак (из зерен кукурузы), колбасы, приправы [1)], модифицированные крахмалы (некоторые типы) [1)], сквашенные сливки с луком [1)], соевая мука, зародыши сои (консервированные, замороженные), соевый белок [1)], соевые напитки [1)], семена/зерна сои, соевый творог, соя (подкисленная) [1)], листья сахарной свеклы, семена сахарной свеклы, семена подсолнечника, рыбный фарш с соей [1)], сахарная кукуруза, шелуха тако, тарамас (паста из икры рыб), табак, томатный кетчуп [1)], томатный концентрат [1)], томаты (плоды), маисовые чипсы [1)], вегетарианский рубленый шницель, вафли [1)], пшеничный крахмал (нативный), йогурт [1)].

А.3.1.9 Валидация

Данные по валидации, приведенные в таблице А.5, были получены в результате совместного исследования, выполненного рабочей группой «Разработка методов идентификации пищевой продукции, полученной с использованием способов генной инженерии» Комиссии Федерального управления по охране здоровья Германии для внедрения методов согласно статье 35 закона Германии о пищевой продукции (см. [25]–[27]). В качестве испытуемых матриц использовались картофель, соя и томаты. При проведении этих межлабораторных испытаний методика выполнялась на пробах массой 100 мг. Стадия ЦТАБ-осаждения была необходима для анализа сои и соевой муки. Стадии с использованием ферментов не выполнялись в этих межлабораторных испытаниях.

При совместном исследовании сои две из участвующих лабораторий использовали сильно измененные процедуры, а в одной лаборатории испытание пяти проб было прервано. Таким образом, 22 из 25 участников правильно идентифицировали все 110 проб.

При проведении совместного исследования картофеля три пробы дали ошибочные негативные результаты, а одна проба дала ошибочный позитивный результат. Три пробы не были оценены из-за получения неоднозначных результатов между двумя повторными анализами.

Таблица А.5 – Данные по валидации

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

[1)] Повторяемость может зависеть от различий в партии матрицы и/или технологии ее получения. В некоторых случаях ДНК может быть не обнаружена, или она подвергается деградации таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых затравок и процедур выполнений ПЦР. Это может быть источником низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

[2)] Повторяемость может зависеть от различий в партии матрицы и/или технологии ее получения. В некоторых случаях ДНК может быть не обнаружена, или она подвергается деградации таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых затравок и процедур выполнений ПЦР. Это может быть источником низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

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

А.4.1 Основной метод на основе диоксида кремния

А.4.1.1 Общие положения

Данный метод пригоден для экстрагирования ДНК из широкого диапазона матриц (см. примеры в А.4.1.8). Этот метод также может применяться как стадия дополнительной очистки растворов ДНК, полученных после экстрагирования ДНК другими методами.

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

Данный метод не рекомендуется для экстрагирования ДНК из матриц с высоким содержанием жира.

А.4.1.2 Статус валидации

Этот метод прошел внутрилабораторную проверку и используется для систематических анализов во многих лабораториях. Метод не подвергался оценке путем официальных межлабораторных сличений. Принцип этого метода положен в основу множества наборов и тест-систем для экстрагирования ДНК, которые успешно прошли кольцевое тестирование (см. [29]–[31]).

А.4.1.3 Принцип

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

Пользователям настоящего стандарта доводится до сведения, что на методы на основе диоксида кремния могут распространяться патентные права [33].

А.4.1.4 Меры безопасности

Все работы с органическими реагентами должны выполняться в вытяжном шкафу.

А.4.1.5 Реагенты

А.4.1.5.1 Хлорид натрия (NaCl).

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

А.4.1.5.3 Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Na_2EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

А.4.1.5.4 Соляная кислота, *c*(HCl) = 37 %.

А.4.1.5.5 Гидроксид натрия (NaOH).

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

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

А.4.1.5.8 Гидрохлорид гуанидина (CH_5N_3-HCl).

А.4.1.5.9 Хлорид калия (KCl).

А.4.1.5.10 Гидроортофосфат натрия (Na_2HPO_4).

А.4.1.5.11 Дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4).

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

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

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

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

А.4.1.5.15 Раствор протеиназы-К, ρ = 20 мг/мл.

Растворяют фермент в стерильной воде или буферном растворе, как описано в [34]. Раствор не автоклавировать. Хранить в аликвотах при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.4.1.5.16 Раствор I гидрохлорида гуанидина, $c(CH_5N_3 \cdot HCl)$ = 5 моль/л.

Автоклавировать не более 15 мин при температуре 121 °С.

А.4.1.5.17 Раствор II гидрохлорида гуанидина, $c(CH_5N_3 \cdot HCl)$ = 6 моль/л.

Автоклавировать не более 15 мин при температуре 121 °С.

А.4.1.5.18 Буферный раствор PBS, c(NaCl) = 0,157 моль/л, c(KCl) = 0,0027 моль/л, $c(Na_2HPO_4)$ = 0,010 моль/л, $c(KH_2PO_4)$ = 0,0018 моль/л.

Довести значение pH до 7,5 HCl.

А.4.1.5.19 Суспензия диоксида кремния

Взвесить 5 г диоксида кремния (А.4.1.5.13) в пробирке вместимостью 50 мл и добавить 50 мл буферного раствора PBS (А.4.1.5.18). Хорошо перемешать и оставить для осаждения на 2 ч. Удалить образовавшийся сверху слой путем отсасывания с помощью пипетки. Добавить еще 50 мл буферного раствора PBS, хорошо перемешать и оставить для осаждения на 2 ч. Удалить образовавшийся сверху слой путем отсасывания. Центрифугировать в течение 2 мин при ускорении 2000 g. Отбросить верхний слой. После центрифугирования повторно растворить осадок в пробирке 50 мл раствора гидрохлорида гуанидина II (А.4.1.5.17). Использовать в пределах 2–5 мес. Хорошо перемешивать перед использованием.

А.4.1.5.20 Буферный раствор для экстрагирования TNE-SDS, c(NaCl) = 0,150 моль/л, c(Трис) = 0,002 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,002 моль/л, ρ(SDS) = 10 г/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH и выдержать в автоклаве перед добавлением SDS.

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

А.4.1.5.22 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,010 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.4.1.5.23 Раствор рибонуклеазы-А, ρ = 10 мг/мл.

Хранить в аликвотах при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.4.1.6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

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

На некоторых стадиях анализа необходимо использование центрифуги с охлаждением.

А.4.1.6.2 Инкубатор с рабочей температурой 60 °С.

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

А.4.1.6.4 Смеситель, например Vortex [1)].

А.4.1.6.5 Пробирки для центрифугирования вместимостью 50 мл для приготовления суспензии диоксида кремния.

А.4.1.7 Методика

А.4.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления пробы для анализа из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК. При изменении величины навески пробы требуется соответственно масштабировать массы реагентов и объемы реактивов.

А.4.1.7.2 Методика экстрагирования

Взвесить 200–300 мг размолотого или измельченного материала в пробирку. Добавить 2 мл буферного раствора для экстрагирования (А.4.1.5.20) и 20 мкл раствора протеиназы-К (А.4.1.5.15). Инкубировать в течение 1–5 ч при температуре 60 °С. Во время инкубирования необходимо сильно встряхивать пробы (приблизительно 250 $мин^{-1}$). Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении 2000 g. Перенести 550 мкл образовавшегося сверху слоя в новую пробирку.

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

Обработать перенесенный слой 2 мкл раствора рибонуклеазы (А.4.1.5.23) в течение 5 мин при температуре 37 °С (эту стадию гидролизования РНК рекомендуется проводить перед стадией связывания диоксидом кремния, в противном случае гидролизованная РНК и полученные в результате нуклеотиды могут оказывать влияние на последующие измерения на ультрафиолетовом спектрометре). Добавить к этому слою 55 мкл раствора I гидрохлорида гуанидина (А.4.1.5.16) и 100 мкл суспензии диоксида кремния (А.4.1.5.19). Осторожно перемешать несколько раз. Оставить пробирки на лабораторном столе приблизительно на 1 мин.

Центрифугировать в течение 2 мин при ускорении около 800 g. Отбросить образовавшийся сверху слой и добавить 500 мкл раствора изопропанола (А.4.1.5.21). Закрыть пробирки и перемешать, желательно, с помощью смесителя (А.4.1.6.4), для повторного полного растворения осадка после центрифугирования.

Центрифугировать в течение 2 мин при ускорении приблизительно 1500 g. Отбросить образовавшийся сверху слой и высушить осадок после центрифугирования. Добавить 100 мкл буферного раствора ТЕ (А.4.1.5.22). Осторожно перемешать для повторного растворения осадка после центрифугирования. Инкубировать при температуре 60 °С в течение 5 мин. Центрифугировать в течение 5 мин при ускорении 2000 g. Перенести 80 % образовавшегося сверху слоя в новую пробирку. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы не перенести частицы диоксида кремния, которые оказывают ингибирующее воздействие на ферменты (например, ДНК-полимеразы, эндонуклеазы).

Обработать перенесенный слой 2 мкл раствора рибонуклеазы (А.4.1.5.23) в течение 1 ч при температуре 37 °С или в течение всей ночи при комнатной температуре. Этот раствор является основным раствором ДНК.

А.4.1.8 Перечень примеров

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

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

А.5.1 Основной метод на основе гуанидина-хлороформа

А.5.1.1 Общие положения

Данный метод пригоден для экстрагирования ДНК из широкого диапазона матриц пищевой продукции и кормов (см. А.5.1.8). В зависимости от состава пробы в некоторых случаях может потребоваться стадия дополнительной очистки.

А.5.1.2 Статус валидации

Этот метод был проверен с применением процедуры внутрилабораторной проверки.

А.5.1.3 Принцип

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

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

А.5.1.4 Меры безопасности

Все работы с органическими реагентами должны выполняться в вытяжном шкафу.

А.5.1.5 Реагенты

А.5.1.5.1 α-амилаза типа IIa, вида *Bacillus*, 1500–5000 ед./мг лиофилизата.

[1)] Повторяемость может зависеть от различий в партии матрицы и/или технологии ее получения. В некоторых случаях ДНК может быть не обнаружена, или она подвергается деградации таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых затравок и процедур выполнений ПЦР. Это может быть источником низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

А.5.1.5.2 Ледяная уксусная кислота (CH_3COOH).

А.5.1.5.3 Хлороформ ($CHCl_3$).

А.5.1.5.4 Этанол, $c(C_2H_5OH)$ = 96 %.

А.5.1.5.5 Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Na_2EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

А.5.1.5.6 Гидрохлорид гуанидина (CH_5N_3-HCl).

А.5.1.5.7 Соляная кислота, c(HCl) = 37 %.

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

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

А.5.1.5.10 Рибонуклеаза-А, свободная от дезоксирибонуклеазы, из бычьей поджелудочной железы, приблизительно 50 Kunitz ед./мг лиофилизата.

А.5.1.5.11 Хлорид натрия (NaCl).

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

А.5.1.5.13 Гидроксид натрия (NaOH).

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

А.5.1.5.15 Раствор α-амилазы, ρ = 10 мг/мл, растворенной в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.5.1.5.16 Раствор этанола, $c(C_2H_5OH)$ = 70 %.

А.5.1.5.17 Буферный раствор для экстрагирования, c(Трис) = 0,1 моль/л, c(NaCl) = 0,15 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,05 моль/л, ρ(SDS) = 10 г/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.5.1.5.18 Раствор гидрохлорида гуанидина, $c(CH_5N_3$-HCl) = 5 моль/л.

Автоклавировать после приготовления (не более 15 мин при температуре 121 °С).

А.5.1.5.19 Раствор протеиназы-К, ρ = 20 мг/мл, растворенной в стерильной воде.

Не автоклавировать. Хранить при температуре минус 20 °С, избегать многократного замораживания и оттаивания.

А.5.1.5.20 Раствор рибонуклеазы-А, ρ = 10 мг/мл.

Хранить в аликвотах при температуре минус 20 °С.

А.5.1.5.21 Буферный раствор ТЕ, c(Трис) = 0,01 моль/л, $c(Na_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

Довести значение pH до 8,0 HCl или NaOH.

А.5.1.6 Оборудование

А.5.1.6.1 Центрифуга, обеспечивающая ускорение 8000 g. На некоторых стадиях анализа необходимо использование центрифуги с охлаждением.

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

А.5.1.6.3 Смеситель, например Vortex [1)].

А.5.1.7 Методика

А.5.1.7.1 Общие положения

Сразу после приготовления пробы для анализа из исследуемой продукции (матрицы) необходимо выполнить описанную ниже процедуру экстрагирования и очистки ДНК.

При изменении величины навески пробы требуется соответственно масштабировать массы реагентов и объемы реактивов.

А.5.1.7.2 Методика экстрагирования

Взвесить 200–500 мг измельченной пробы в микропробирку. Добавить 1,6 мл предварительно нагретого буферного раствора для экстрагирования (А.5.1.5.17).

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

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

Добавить 20 мкл раствора протеиназы-К (А.5.1.5.19), плавно перемешать, переворачивая пробирку вручную, и инкубировать не менее 2 ч при температуре 60 °С при умеренном перемешивании. Оставить пробирки на лабораторном столе на 15 мин, затем центрифугировать в течение 15 мин при 8000 g.

Перенести образовавшийся сверху слой в новую пробирку. Добавить один объем хлороформа (А.5.1.5.3) и перемешать с помощью смесителя (А.5.1.6.3). Центрифугировать в течение 15 мин при ускорении 8000 g. Перенести образовавшийся сверху слой в новую пробирку. Добавить 0,6 объема изопропанола (А.5.1.5.8), перемешать путем переворачивания. Оставить пробирки на льду на 50 мин.

Центрифугировать в течение 20 мин при ускорении 8000 g. Промыть осадок после центрифугирования не менее чем 2 мл раствора этанола (А.5.1.5.16) и центрифугировать в течение 10 мин при ускорении 8000 g. Эта стадия является важной для удаления любых солей, которые могут оказывать влияние на последующий анализ (например, ингибирование ПЦР). Отбросить образовавшийся сверху слой. Высушить осадок после центрифугирования и повторно растворить его в 100 мкл воды или соответствующего буферного раствора, например буферного раствора ТЕ (А.5.1.5.21). Этот раствор является основным раствором ДНК. Если потребуется дополнительная стадия очистки, то ее необходимо выполнять на основном растворе ДНК.

А.5.1.8 Перечень примеров

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

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

А.5.2 Руководство по методу с использованием хлороформа. Протокол для соевого лецитина

А.5.2.1 Цель, соответствие и научное обоснование

Соевый лецитин является часто встречаемым ингредиентом и используется в пищевой продукции в качестве эмульгатора. Соевый лецитин может производиться либо с использованием генетически модифицированных (ГМ), либо немодифицированных соевых бобов. Метод, описанный в настоящем стандарте, может использоваться для экстракции ДНК, которая присутствует в пробе, в целях выполнения последующих анализов ПЦР для определения ГМ последовательностей ДНК, произведенной из ГМ соевых бобов.

Метод основан на [44], а также сходная процедура была валидирована во время совместных испытаний в Швейцарии. В данном исследовании в целях интерпретации количество экстрагированной ДНК было определено с использованием спектрометрического метода [35], пункт 1.3. Институт химии и ветеринарии (Фрайбург, Германия) провел дополнительные совместные исследования с 12 лабораториями-участницами, в которых количество экстрагированной соевой ДНК определялось посредством использования количественного метода ПЦР в реальном времени. С полученными результатами можно ознакомиться в [45].

А.5.2.2 Область применения

Данный метод описывает процедуру экстракции ДНК из соевых лецитинов в сырье и растительных маслах холодного отжима соответственно. Если содержание ДНК в материале пробы является низким, то метод ПЦР в реальном времени используется для количественного определения количества ДНК, выделенной из анализируемой части пробы, а также для расчета практического предела определения, достигаемого в анализе ПЦР в отношении экстрагированной ДНК соответственно.

[1)] Повторяемость может зависеть от различий в партии матрицы и/или технологии ее получения. В некоторых случаях ДНК может быть не обнаружена, или она подвергается деградации таким образом, что результаты ПЦР оказываются ниже предела обнаружения метода независимо от используемых затравок и процедур выполнений ПЦР. Это может быть источником низкой воспроизводимости результатов между лабораториями.

А.5.2.3 Статус валидации и критерии эффективности

А.5.2.3.1 Критерии валидации

Метод, описанный в данном пункте, был валидирован в процессе совместных испытаний с целью определения количества экстрагируемой ДНК из соевых бобов посредством количественной ПЦР в реальном времени. Совместные исследования проводились в соответствии с IUPAC [46].

А.5.2.3.2 Надежность метода

Метод использовался для проведения рутинных испытаний в государственных и частных лабораториях, которые занимаются испытаниями ГМО в Германии и Швейцарии в течение более 10 лет. На данном этапе времени каких-либо проблем выявлено не было. Хотя некоторые данные о надежности (например, в случае изменения параметров метода) отсутствуют, опыт лабораторий показал, что небольшие вариации в условиях не влияют на эффективность используемого метода.

А.5.2.3.3 Межлабораторные испытания

Материалы, использованные в совместных исследованиях, были испытаны в лаборатории разработчика метода в отношении его межлабораторной прецизионности.

Для оценки прецизионности были проанализированы пять подготовленных экстрактов ДНК из каждой из пяти проб соевых лецитинов с использованием ПЦР в реальном времени в условиях повторяемости с применением генспецифичного метода для соевого лецитина в соответствии с [41], пункт С.2. Полученные результаты приведены в таблице А.6.

Таблица А.6 – Межлабораторная валидация метода экстракции ДНК с использованием пяти проб лецитина соевых бобов (n = 5 экстракций в каждом случае)

Номер пробы лецитина	Среднее количество копий лектина	Стандартное отклонение повторяемости s_r, количество копий	Коэффициент изменения повторяемости $C_{V,r}$, %
1	20 464	5 367	26
2	3 203	620	19
3	2 005	306	15
4	6 978	331	5
5	14	8	61

Перед проведением совместных испытаний ДНК, экстрагированная из пяти коммерчески доступных соевых лецитинов, была испытана на присутствие ингибиторов ПЦР. ДНК, выделенная из каждой пробы, была впоследствии разведена с использованием буферного раствора ТЕ (один объем ДНК, разведенный четырьмя объемами буферного раствора ТЕ; один объем первого разведения ДНК, разведенный четырьмя объемами буферного раствора ТЕ, один объем второго разведения ДНК, разведенный четырьмя объемами буферного раствора ТЕ). Если разность между рассчитанным (экстраполированным) значением C_t неразведенной пробы ДНК и измеренным значением C_t каждого раствора ДНК составляла менее 0,1, то подготовленные растворы ДНК не содержали ингибиторов ПЦР.

А.5.2.3.4 Совместные испытания

Совместные испытания (валидационные исследования) были проведены в 12 лабораториях [45]. Были использованы пять коммерчески доступных проб соевого лецитина. Каждая лаборатория получила 15 закодированных проб и стандартных образцов ДНК для калибровки. Пробы были распределены таким образом, что каждый участник получил три идентичные пробы каждого из пяти соевых лецитинов. Каждая лаборатория выполнила одну экстракцию ДНК для каждой пробы. Для оценки совместного исследования представленные результаты были присвоены пяти различным пробам лецитина.

В экстрагированных растворах ДНК была амплифицирована последовательность гена соевого лецитина методом ПЦР в реальном времени, описанным в [41], пункт С.2. Стандартный образец ДНК для калибровки был выделен из соевой муки [ERM BF410a [1)]] с использованием Plant Mini Kit [2)] (Qiagen, Хильден/Германия), начиная с экстракции ЦТАБ (см. А.3). Концентрация выделенной ДНК была оценена флуориметрическим методом PicoGreen [1)] dsДНК [17]. Стандартные образцы ДНК были определены как количество копий (ср) гаплоидного генома на микролитр (ср/мкл). Для расчета принималось значение массы 1,13 пг гаплоидного генома соевых бобов. Была подготовлена серия растворов в диапазоне от 50 000 до 80 ср/5 мкл. Семь лабораторий использовали ABI [1)], оборудование для ПЦР в реальном времени (ABI 7000, 7500, 7700), а пять лабораторий использовали Light Cycler [1)] (Roche) со следующими модификациями в соответствии с протоколом, описанным в [41], пункт С.2. Конечный объем ПЦР смеси 20 мкл, состоящий из QuantiTect Probe ПЦР Master Mix [1)] (Qiagen), праймеров GM1-F и GM1-R с концентрацией 500 нмоль/л каждый и зонда GM1 с концентрацией 150 нмоль/л. Программа (термический цикл) ПЦР в реальном времени является следующей: начальный этап 900 с при температуре 95 °С, затем 45 циклов по 10 с при температуре 95 °С, 30 с при температуре 60 °С и 30 с при температуре 72 °С. Регистрация сигнала флуоресценции выполнялась в течение этапа элонгации цепи. Скорость изменения температуры была установлена на 2 °С/с.

В качестве критерия соответствия метода практический предел определения LOD_{prac} для модифицированной сои был определен в соответствии с ISO 24276. Значение рассчитывалось индивидуально для каждой пробы с использованием формулы (А.1)

$$LOD_{prac}\% = \frac{LOD_{abs}}{c_{S,\,DNA}} \times 100, \qquad (A.1)$$

где LOD_{abs} – абсолютный предел определения LOD (ПО) события специфичного метода ПЦР в реальном времени в копиях, полученных в результате реакции амплификации.

Примечание – Для расчетов в таблице А.7 присвоенное значение LOD равно 10 копиям.

$c_{S,\,DNA}$ – количество амплифицируемой ДНК из соевых бобов в пробе, в копиях, полученных в результате реакции амплификации, определенное посредством метода ПЦР в реальном времени (метод является специфичным для референсного гена соевых бобов).

В таблице А.7 приведена сводная информация о результатах совместных исследований. В четырех из пяти проб лецитина были получены средние значения LOD_{prac} ниже 0,9 % (пример для существующего нормативного порога). Для пробы лецитина № 2 значение LOD_{prac} превышало 0,9 % только в одной лаборатории, для пробы лецитина № 3 – в двух лабораториях. Для пробы лецитина № 5 все лаборатории амплифицировали менее 80 копий гена лецитина, и, таким образом, значение LOD_{prac} , равное 0,9 % или ниже, невозможно было получить. Также был рассчитан коэффициент изменения воспроизводимости для количества копий гена лектина, указанный для пяти проб лецитина. В общей сложности для оценки использовались данные ПЦР в реальном времени для 36 экстракций на каждую пробу лецитина. Для расчета коэффициента изменения воспроизводимости $C_{V,R}$ обособленные результаты не удалялись. Данные прецизионности для пробы № 5 не могут быть представлены ввиду малого количества копий гена лектина ниже, чем *LOQ* метода. Следует отметить, что данные о прецизионности отражают коэффициент изменения воспроизводимости количества копий, экстрагированных из проб лицетина в условиях воспроизводимости в совместных испытаниях.

[1)] Продукция является коммерчески доступной. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Может использоваться эквивалентная продукция, если их применение приводит к тем же результатам.

[2)] Колонка и тест-система, которые указаны выше, представляют собой примеры соответствующих продуктов, доступных на рынке. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Могут использоваться эквивалентные продукты, если их применение приводит к тем же результатам.

Таблица А.7 – Сводная информация по валидационным данным

Номер пробы лецитина	Среднее число копий лектина	Коэффициент изменения воспроизводимости $C_{V,R}$, %	Средний практический предел определения, LOD_{prac}, %	Число лабораторий с LOD_{prac} < 0,9 %
1	17 044	67	0,06	12/12
2	3 630	63	0,28	11/12
3	2 318	57	0,43	10/12
4	8 325	52	0,12	12/12
5	< 80	Не определен	> 10	0/12

А.5.2.4 Общий принцип метода

Пробы вязкой консистенции гомогенизируются после нагревания, после добавления гуанидинтиоцианатного буферного раствора для дальнейшей экстракции используют гексан. Интерферирующие сопровождающие вещества удаляют посредством экстракции с применением хлороформа, а РНК, присутствующая в растворе, разрушается посредством рибонуклеазы-А. ДНК осаждается изопропанолом в присутствии гликогена, а затем промывается этанолом и растворяется в воде. Для очистки ДНК выполняют последующий этап гель-фильтрации (используют гели поперечно-емкостного декстрана сефадексы и сефакрилы) для эксклюзионной (ситовой) хроматографии.

А.5.2.5 Термины и определения

В настоящем пункте используют термины и определения, приведенные в [43] и ISO 24276.

А.5.2.6 Виды и количество проб

Убеждаются, что анализируемая проба является репрезентативной для лабораторной пробы. Измерения и операционные действия описаны в 5.1. Материал пробы должен являться максимально однородным.

А.5.2.7 Оценка неопределенности измерений

Неопределенность измерений лектина при использовании данных ПЦР в реальном времени при совместных исследованиях дается как коэффициент изменения воспроизводимости. Полученные результаты приведены в таблице А.7.

А.5.2.8 Интерференции

Степень очистки лецитина может влиять на экстракцию ДНК из проб лецитина вследствие того, что процесс очистки лецитина сопровождается деградацией ДНК.

А.5.2.9 Условия окружающей среды

Специальных условий не требуется. Подробную информацию см. в ISO 24276.

А.5.2.10 Оборудование

Используют обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

А.5.2.10.1 Настольная центрифуга для центрифужных сосудов вместимостью 1,5 или 2 мл, с ускорением как минимум 12 000 g.

А.5.2.10.2 Центрифуга для центрифужных пробирок вместимостью 50 мл, с ускорением как минимум 4000 g.

А.5.2.10.3 Полипропиленовые центрифужные сосуды вместимостью 1,5; 2,0 и 50 мл для использования в центрифугах с ускорением 12 000 и 4 000 g.

А.5.2.10.4 Шейкер-инкубатор (нагревательный блок со встряхивающим устройством) [1].

А.5.2.10.5 Вакуумная сушилка (при необходимости).

А.5.2.10.6 Смеситель, например Vortex [2].

[1] Термомиксер Eppendorf – пример подходящего продукта, имеющегося на рынке. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения.

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

А.5.2.10.7 Термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени, оснащенный источником энергии, который вызывает возбуждение флуоресцентных молекул, а также системой оптической детекции, способной улавливать сигналы флуоресценции, генерируемые в процессе ПЦР.

А.5.2.10.8 Реакционные сосуды и крышки, которые выдерживают повторный нагрев до температуры 100 °С и охлаждение до 4 °С без повреждений и не влияют на флуоресцентный сигнал, генерируемый в процессе амплификации.

А.5.2.10.9 Ультрафиолетовый спектрофотометр или флуориметр для определения концентрации ДНК.

А.5.2.11 Реагенты и материалы

Для получения информации о качестве используемых реагентов см. ISO 24276.

А.5.2.11.1 Гуанидин-тиоцианат.

А.5.2.11.2 Трис(гидроксиметил)аминометан (трис) или **трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид** (трис·HCl).

А.5.2.11.3 Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na_2EDTA).

А.5.2.11.4 Панкреатическая рибонуклеаза-А (РНК-А).

А.5.2.11.5 Гликоген.

А.5.2.11.6 Трет-Октилфеноксиполиэтоксиэтанол [4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенилполиэтиленгликоль] [Triton X 100 [1)]].

А.5.2.11.7 н-Гексан.

А.5.2.11.8 Хлороформ.

А.5.2.11.9 Хлорид натрия.

А.5.2.11.10 Гидроксид натрия.

А.5.2.11.11 Соляная кислота c(HCl) = 0,1 моль/л.

А.5.2.11.12 Раствор гидроксида натрия c(NaOH) = 0,1 моль/л. Взвешивают 10 г гидроксида натрия в мерной колбе вместимостью 250 мл и доводят до метки водой.

А.5.2.11.13 Изопропанол (2-пропанол).

А.5.2.11.14 Этанол $c(C_2H_5OH)$, объемная доля 70 %. Смешивают 70 мл этанола с 30 мл воды.

А.5.2.11.15 Буферный раствор Трис HCl, pH = 6,4, c(трис·HCl) = 0,1 моль/л. Растворяют 1,57 г трис·HCl примерно в 70 мл воды, доводят pH до значения 6,4, используя HCl, затем переливают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой.

А.5.2.11.16 Буферный раствор Трис HCl + NaCl, pH = 7,5, c(трис·HCl) = 10 ммоль/л, c(NaCl) = 15 ммоль/л. Растворяют 0,166 г трис·HCl и 88 мг хлорида натрия примерно в 70 мл воды, доводят pH до значения 7,5, используя HCl, затем переливают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой.

А.5.2.11.17 Раствор EDTA, pH = 8,0, c = 0,5 моль/л. Растворяют 18,6 г Na_2EDTA примерно в 70 мл воды, доводят pH до значения 8,0, используя гранулы гидроксида натрия, а затем – раствор гидроксида натрия. Переливают полученный раствор в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки водой.

А.5.2.11.18 Буферный раствор ТЕ, c(трис) = 0,010 моль/л и $c(Na_2EDTA)$ = 0,001 моль/л.

А.5.2.11.19 Гуанидин-тиоцианатный буферный раствор, c(трис·HCl) ≈ 4,6 моль/л, $c(Na_2EDTA \cdot 2H_2O)$ ≈ 0,02 моль/л, ρ[Triton X 100 [1)]] ≈ 11,8 г/л. Для приготовления буферного раствора смешивают 2,6 г Triton X 100 [1)] (А.5.2.11.6) и 120 г гуанидин-тиоцианата (А.5.2.11.1). Затем к полученной смеси добавляют 100 мл буферного раствора трис·HCl (А.5.2.11.15), 8,8 мл раствора EDTA (А.5.2.11.17) и 13,2 мл воды, после чего перемешивают до полного растворения. Конечный объем буферного раствора будет примерно 220 мл при ~ pH 7,2. Раствор можно хранить как минимум 12 мес при комнатной температуре.

А.5.2.11.20 Раствор рибонуклеазы А, ρ(РНК-А) ≈ 10 мг/мл в соответствии с инструкциями производителя или [3], пункт В.17.

Растворяют 10 мг РНК-А (А.5.2.11.4) в 1,0 мл буферного раствора трис·HCl + NaCl (А.5.2.11.16). Выдерживают раствор в течение 15–20 мин при температуре 95 °С, затем медленно охлаждают до комнатной температуры и разделяют на аликвоты по 50 мкл. Хранят раствор в замороженном состоянии, избегая повторного замораживания и оттаивания.

[1)] Колонка и тест-система, которые указаны выше, представляют собой примеры соответствующих продуктов, доступных на рынке. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Могут использоваться эквивалентные продукты, если их применение приводит к тем же результатам.

А.5.2.11.21 Раствор гликогена, ρ(гликоген) ≈ 20 мг/мл. Взвешивают 200 мг гликогена в пластиковой центрифужной пробирке вместимостью 15 мл, затем добавляют 10 мл деионизированной воды, после чего перемешивают до полного растворения. Разлитый на аликвоты раствор можно хранить в течение 24 мес при температуре 5 °С.

А.5.2.11.22 Буферный раствор для элюции (0,2 ТЕ), *c*(трис·HCl) = 2 ммоль/л, *c*(EDTA) = 0,2 ммоль/л, pH 8,0. Растворяют 158 мг трис·HCl и 37 мг Na_2EDTA примерно в 400 мл воды, доводят pH до значения 8,0. Переливают полученный раствор в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят до метки водой. Автоклавируют раствор. Разлитый на аликвоты раствор можно хранить в течение 12 месяцев при комнатной температуре.

А.5.2.11.23 Колонка MicroSpin S-300 HR для дополнительной очистки ДНК (Amersham Pharmacia Biotech) [1].

А.5.2.11.24 Тест-система для количественного определения Quant-iT PicoGreen dsДНК для количественной флуориметрии ДНК (Invitrogen) необязательная [1].

А.5.2.12 Отбор, транспортировка, консервация и хранение проб

Специальные требования отсутствуют.

А.5.2.13 Подготовка анализируемой пробы

Используют следующий протокол экстракции и очистки ДНК. При изменении размера навески анализируемой пробы требуется соответственно масштабировать массы реактивов и объемы буферных растворов.

Как правило, навески лецитина или растительных масел, которые не были очищены, отбирают (взвешивают) непосредственно от представленных проб. Отбор навесок от проб лецитина вязкой консистенции проводят после нагрева до температуры 60 °С и тщательного перемешивания.

А.5.2.14 Калибровка средств измерений

Средства измерений необходимо калибровать в соответствии с [39].

А.5.2.15 Методика

А.5.2.15.1 Общие положения

Пробы вязкой консистенции гомогенизируются после нагревания, после добавления гуанидин-тиоцианатного буферного раствора для дальнейшей экстракции используют гексан. Интерферирующие сопровождающие вещества удаляются посредством экстракции с применением хлороформа, а РНК, присутствующая в растворе, разрушается посредством рибонуклеазы-А. ДНК осаждается изопропанолом в присутствии гликогена, а затем промывается этанолом и растворяется в воде. Для очистки ДНК от ингибиторов ПЦР выполняют последующий этап гель-фильтрации.

А.5.2.15.2 Методика экстрагирования ДНК

Взвешивают 2,5 г максимально однородного материала пробы в полипропиленовом центрифужном сосуде вместимостью 50 мл.

Параллельно необходимо выполнить соответствующую процедуру экстрагирования ДНК с контрольной холостой пробой.

Добавляют 15 мл н-гексана и растворяют лецитин.

Добавляют 2 мл гуанидин-тиоцианатного буферного раствора и тщательно перемешивают (например, в течение 10–20 с с помощью смесителя).

Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 4000 g.

Удаляют большую часть верхней гексановой фазы.

Переносят нижнюю водную фазу (без осадка) в стерильный полипропиленовый реакционный сосуд вместимостью 2 мл.

Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 10 000 g.

Переносят 1 мл нижней водной фазы в стерильный полипропиленовый реакционный сосуд вместимостью 2 мл.

Добавляют 0,5 мл хлороформа и тщательно перемешивают в течение примерно 2 мин.

Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении 10 000 g.

---

[1] Колонка и тест-система, которые указаны выше, представляют собой примеры соответствующих продуктов, доступных на рынке. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Могут использоваться эквивалентные продукты, если их применение приводит к тем же результатам.

Переносят 500–750 мкл водной фазы в новый полипропиленовый реакционный сосуд вместимостью 1,5 мл и добавляют 5 мкл раствора рибонуклеазы-А (в процессе совместных исследований проводилась обработка рибонуклеазой-А, но ее можно не проводить, если это допускается, и как в данном случае непосредственно перейти к добавлению гликогена).

Инкубируют смесь в течение 10 мин при комнатной температуре для гидролиза любой РНК, выделенной совместно с ДНК.

Добавляют 4 мкл раствора гликогена и 0,8 объемов изопропанола (по отношению к объему полученного верхнего слоя), аккуратно перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.

Центрифугируют в течение 10 мин при ускорении не менее 12 000 g.

Удаляют верхний слой; промывают осадок ДНК, добавив к нему 500 мкл этанола.

Центрифугируют в течение 5 мин при ускорении не менее 12 000 g.

Аккуратно удаляют верхний слой и высушивают осадок ДНК при комнатной температуре или в вакууме.

Растворяют осадок ДНК в 50 мкл буферного раствора для элюции (например, в холодильнике в течение ночи; если растворилось не полностью, то слегка нагревают).

А.5.2.15.3 Очистка ДНК посредством гель-фильтрации

Готовую к использованию гель-фильтрационную колонку используют для дополнительной очистки ДНК. Могут также использоваться другие колонки или методы очистки, если таковые соответствуют поставленным целям и обеспечивают эквивалентные результаты.

Ресуспендируют смолу в колонке Microspin S300 HR [1)], интенсивно перемешивая.

Слегка приоткрывают винтовую крышку, повернув ее на четверть оборота, и вскрывают нижнюю часть колонки.

Помещают колонку Microspin S300 HR [1)] в полипропиленовый реакционный сосуд вместимостью 3 мл.

Центрифугируют в течение 1 мин при ускорении 770 g.

Помещают колонку Microspin S300 HR [1)] в новый полипропиленовый реакционный сосуд вместимостью 1,5 мл, удаляя винтовую крышку.

Медленно загружают раствор ДНК (50 мкл) в колонку.

Центрифугируют в течение 2 мин при ускорении 770 g.

ДНК присутствует в элюате. Растворы ДНК необходимо хранить в охлажденном виде не более 1–2 нед при температуре 4 °С; для более продолжительного хранения требуется температура минус 20 °С.

А.5.2.15.4 Количественное определение ДНК

Если количество ДНК, выделенной из пробы, является достаточным, то количественное определение ДНК выполняют спектрометрическим методом, используя УФ-спектрометр, описанный в В.1. Концентрацию ДНК оценивают, используя флуориметрический метод PicoGreen [1)] dsДНК (см. [17]) с применением тест-системы (А.5.2.11.24) или эквивалентной продукции.

Так как лецитин обладает низким содержанием ДНК, количественное определение ДНК в основном выполняют с использованием ПЦР в реальном времени (см. В.3). Метод для количественного определения гена соевого лецитина приводится в [41] (пункт С.2).

А.5.2.15.5 Оценка целостности ДНК

Целостность ДНК, полученной в результате экстракции, в дальнейшем не оценивается, так как качественный критерий для экстрагированной ДНК – это ее амплифицируемость при последующем ПЦР-анализе с использованием специальных тест-систем для сои, где последовательность ДНК мишени ≤ 100 пар оснований.

А.5.2.15.6 Приготовление стандартных образцов

Стандартный образец ДНК для калибровки выделяют из соевой муки [ERM BF410a [1)]] с использованием протокола ЦТАБ. Концентрацию выделенной ДНК оценивают флуориметрическим методом PicoGreen [1)] dsДНК (см. [17]).

[1)] Колонка и тест-система, которые указаны выше, представляют собой примеры соответствующих продуктов, доступных на рынке. Эта информация приводится для удобства пользователей настоящего стандарта и не означает обязательность его применения. Могут использоваться эквивалентные продукты, если их применение приводит к тем же результатам.

А.5.2.15.7 Критерии оценки результата

Количество амплифицируемых последовательностей ДНК в пробе (количество копии), определенное методом ПЦР в реальном времени, является достаточным для достижения практического ПО (LOD) 0,9 % или менее для ГМО специфичной ДНК.

А.5.2.15.8 Идентификация

Результат метода экстракции ДНК может быть оценен с использованием методов обнаружения таксон-специфического гена сои, как указано в [41] (пункт С.2). Могут также применяться другие специализированные методы, если они обеспечивают эквивалентные или более высокие результаты.

А.5.2.16 Идентификация пробы

Все пробы должны иметь однозначную идентификацию.

А.5.2.17 Расчеты

Для расчета практического ПО (LOD) (см. А.5.2.3.4).

А.5.2.18 Ведение записей

Ведение записей должно соответствовать [39].

А.5.2.19 Протокол испытаний

Протокол испытаний оформляется в соответствии с ISO 24276, а также [39].

А.5.2.20 Меры безопасности

При работе с органическими реактивами необходимо надевать защитный капюшон. При проведении работ следует использовать перчатки без талька. Перекрестное загрязнение можно предотвратить, используя наконечники с аэрозольным барьером.

А.5.2.21 Предотвращение загрязнения и утилизация отходов

Специальные требования отсутствуют. См. ISO 24276.

Приложение В
(обязательное)

Методы количественной оценки экстрагированной ДНК

В.1 Основной ультрафиолетовый спектрометрический метод

В.1.1 Общие положения

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

В.1.2 Статус валидации

Данный метод был широко протестирован рядом лабораторий, и результаты были опубликованы [35]. Например, метод был успешно применен при межлабораторных сличениях по обнаружению ГМО, организованных Федеральным министерством общественного здравоохранения в Берне и кантональными лабораториями Базеля и Цюриха (Щвейцария).

В.1.3 Принцип

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

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

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

В.1.4 Область применения

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

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

В.1.5 Реагенты

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

В.1.5.2 Гидроксид натрия (NaOH).

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

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

В.1.5.5 Эталонный раствор ДНК

Приготовить основной раствор ДНК концентрацией 10 мг/мл, растворив 100 мг ДНК-носителя (В.1.5.4) в 10 мл буферного раствора для разбавления (В.1.5.7). ДНК растворяется при этой концентрации очень медленно, и конечный раствор очень вязкий. Затем разбавляют этот приготовленный основной эталонный раствор ДНК буферным раствором для разбавления до требуемой рабочей концентрации (например, 25 мкг/мл).

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

В.1.5.7 Буферный раствор для разбавления, *c*(Трис) = 0,01 моль/л.

Довести значение pH до 9,0 HCl.

В.1.6 Оборудование

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

В.1.6.2 Смеситель, например Vortex [2].

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

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

В.1.7 Методика

В.1.7.1 Измерение эталонного раствора ДНК

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

– при измерении фона (контрольного раствора) сосуд для измерения заполняют только буферным раствором для разбавления (В.1.5.7);

– при измерении эталонного раствора сосуд для измерения заполняют эталонным раствором ДНК (В.1.5.5).

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

В.1.7.2 Измерение испытуемого раствора ДНК неизвестной концентрации

Для приготовления контрольного раствора смешать буферный раствор для разбавления (В.1.5.7) с раствором гидроксида натрия (В.1.1.5.13) таким образом, чтобы была достигнута конечная концентрация NaOH 0,2 моль/л. Этой смесью заполнить сосуд для измерения.

Смешать испытуемый раствор ДНК с раствором гидроксида натрия, чтобы получить конечную концентрацию NaOH 0,2 моль/л (в случае необходимости смешать и с буферным раствором для разбавления). Этой смесью заполнить сосуд для измерения.

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

Пример 1 – Для приготовления контрольного раствора смешать 90 мкл буферного раствора для разбавления и 10 мкл раствора гидроксида натрия и перенести в сосуд для измерения вместимостью 100 мкл.

Пример 2 – Для приготовления испытуемого раствора ДНК смешать 80 мкл буферного раствора для разбавления или воды, 10 мкл раствора гидроксида натрия и 10 мкл раствора ДНК неизвестной концентрации и перенести в сосуд для измерения вместимостью 100 мкл.

---

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

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

B.1.8 Оценка значения

Вычитают (фоновое) значение поглощения (оптической плотности) (OD) на длине волны 320 нм из значения поглощения на длине волны 260 нм, получая исправленное значение поглощения на 260 нм.

Если исправленное значение OD на 260 нм равняется единице, то расчетная концентрация ДНК составляет 50 мкг/мл для двухцепочечной ДНК или 37 мкг/мл для одноцепочечной ДНК (например, денатурированной гидроксидом натрия) соответственно.

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

Массовая концентрация c испытуемого раствора двухцепочечной ДНК с учетом денатурации и используемого коэффициента разбавления рассчитывается по уравнению:

$$c_{ДНК} = F \times (OD_{260} - OD_{320}) \times 37, \quad (1)$$

где F – коэффициент разбавления;

OD_{260} – поглощение на длине волны 260 нм;

OD_{320} – поглощение на длине волны 320 нм;

37 – переводной коэффициент, мкг/мл.

Пример – Для расчета коэффициент разбавления составляет 10, значение OD_{260} – 0,658 и значение OD320 – 0,040:

$c_{ДНК}$ = 10 × (0,658 – 0,040) × 37 мкг/мл = 229 мкг/мл.

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

B.2.1 Общие положения

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

B.2.2 Статус валидации

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

B.2.3 Принцип

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

EtBr интеркалирует в ДНК и при возбуждении ультрафиолетовым светом излучает оранжевую флуоресценцию. Поскольку величина флуоресценции пропорциональна общей массе ДНК, то количество ДНК в пробе можно оценить путем сравнения флуоресценции, излучаемой неизвестной пробой, с флуоресценцией, излучаемой серией стандартных образцов с известным количеством ДНК. Молекулярная масса таких стандартных образцов должна быть аналогична молекулярной массе ДНК, подлежащей количественному анализу, так как интеркалирование EtBr и возникающее в результате него излучение флуоресценции также зависят от длины фрагментов ДНК. EtBr также окрашивает одноцепочечную ДНК и РНК. Для более точной оценки содержания ДНК необходимо с помощью ферментов удалить одноцепочечную ДНК и РНК.

B.2.4 Область применения

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

В.2.5 Меры безопасности

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

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

В.2.6 Реагенты

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

Приминение этого метода не требует наличия реактивов степени чистоты, применяемой в молекулярной микробиологии. Описанные в этом методе растворы обычно не нуждаются в автоклавировании.

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

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

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

В.2.6.4 Стандартный образец количества ДНК, стандартизованный по количеству, соответствующей молекулярной массы (линейная ДНК фага Лямбда для высокомолекулярных масс ДНК и подвергшаяся рестрикции низкомолекулярная ДНК фага Лямбда для низкомолекулярных масс ДНК).

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

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

В.2.6.7 Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Na_2-EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

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

В.2.6.9 Глицерин ($C_3H_8O_3$).

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

В.2.7 Соляная кислота, c(HCl) = 37 %.

В.2.7.1 Гидроксид натрия (NaOH).

В.2.7.2 Трис(оксиметил)-аминометан (Трис) ($C_4H_{11}NO_3$).

В.2.7.3 Буферный раствор TAE (1x), c(Трис) = 0,050 моль/л, c($C_2H_3O_2Na$) = 20 моль/л, c(Na_2-EDTA) = 0,001 моль/л.

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

В.2.7.4 Трис/боратный буферный раствор (TBE) (0,5x), c(Трис) = 0,055 моль/л, c(борная кислота) = 0,055 моль/л, c(Na_2EDTA) = 0,001 моль/л.

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

В.2.7.5 Буферный раствор для загрузки пробы (5x), c(глицерин) = 50 %, c(бромфеноловый синий) = 2,5 г/л и/или c(ксилол цианол) = 2,5 г/л, растворен в буферном растворе для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15).

В.2.7.6 Раствор бромистого этидия, c(EtBr) = 0,5 мг/л.

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

В.2.8 Оборудование

В.2.8.1 Микроволновая печь или кипящая водяная баня

В.2.8.2 Оборудование для электрофореза в агарозном геле со вспомогательными принадлежностями и источником питания.

В.2.8.3 Ультрафиолетовый трансоблучатель или лампа, предпочтительно с длиной волны 312 нм.

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

В.2.8.4 Регистрирующий прибор, например система фотодокументации с пленкой 3000 ASA и УФ-фильтром, соответствующим флуоресценции, излучаемой EtBr.

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

В.2.9 Методика

В.2.9.1 Общие положения

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

В.2.9.2 Приготовление агарозного геля

Гель должен быть не толще 1 см.

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

Взвесить соответствующее количество агарозы (В.2.6.1) и добавить ее в буферный раствор для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15). Кипятить раствор в микроволновой печи или водяной бане (В.2.7.1) до полного растворения агарозы. Дополнить объем, потерянный в результате выпаривания, эквивалентным количеством воды, перемешать при взбалтывании (избегая захвата пузырьков воздуха), охладить раствор до температуры приблизительно 60 °С и выдержать его при этой температуре до использования. Приготовить гелевую подложку (лоток для геля) с соответствующей гребенкой для пробы, расположенной в правильном положении. Налить раствор агарозы на гелевый лоток и дать возможность гелю загустеть при комнатной температуре (обычно рекомендуется в течение 1 ч).

В.2.9.3 Приготовление пробы ДНК

Смешать растворы пробы ДНК (например, 5–10 мкл) приблизительно с 20 % (относительно окончательного объема пробы) буферного раствора для загрузки пробы (В.2.6.16) (например, добавляют 2,5 мкл буферного раствора для загрузки пробы к 10 мкл пробы ДНК), перемешать и внести смесь в лунки (гнезда) для пробы с помощью микропипетки. Если предполагается, что неизвестные пробы будут очень концентрированными, то необходимо разбавить их перед загрузкой в гель.

Для определения размера экстрагированных фрагментов ДНК добавить буферный раствор для загрузки пробы (В.2.6.16) (в соотношении 20 % относительно объема пробы) к соответствующему количеству стандартного образца молекулярной массы ДНК (В.2.6.5) и провести электрофорез параллельно.

Для оценки концентрации неизвестной пробы параллельно должны анализироваться стандартные пробы количества ДНК. Такие пробы содержат известные количества стандартного образца количества ДНК (В.2.6.4) (в пределах динамической области применения метода, т. е. от 5 до 500 нг), разбавленного водой или буферным раствором для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15). Рекомендуется использовать стандартные образцы количества, содержащие по меньшей мере пять калибровочных точек (т. е. различные количества ДНК).

В.2.9.4 Проведение электрофореза

Осторожно вынуть гребенку для проб из геля. Перенести гель (вместе с лотком) в ячейку для электрофореза таким образом, чтобы лунки находились как можно ближе к катоду (отрицательному электроду). Заполнить ячейку буферным раствором для электрофореза (В.2.6.14 или В.2.6.15). Покрыть гель слоем того же буферного раствора толщиной 2 мм и загрузить пробы с помощью микропипетки.

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

B.2.9.5 Окрашивание

После завершения электрофореза выдержать гель в течение 15–50 мин в растворе EtBr (B.2.6.17) при комнатной температуре, если возможно, в темноте (и/или в сосуде из нержавеющей стали с крышкой), осторожно встряхивая.

При необходимости уменьшить фоновое окрашивание путем удаления окраски геля в воде в течение 10–30 мин.

Как вариант окрашиванию, после электрофореза можно добавлять EtBr к гелю перед его разливом. В этом случае добавляют EtBr к гелю до конечной концентрации 0,01 мг на миллилитр геля, охлажденного до температуры 60 °C.

Если гель разливается вместе с EtBr, загрузить неизвестную пробу и стандартные образцы количества ДНК (B.2.6.4) в отдельные лунки, образованные той же гребенкой на том же геле. Иначе количество EtBr будет различным для пробы и стандартного образца, что приведет к ошибочным результатам количественного анализа. Чтобы свести к минимуму проблемы, связанные с движением EtBr в геле, некоторое количество EtBr может быть также добавлено к буферному раствору для электрофореза (в ячейку). После электрофореза в геле обычно не требуется проведения стадии удаления окрашивания.

B.2.9.6 Регистрация геля

Перенести гель на поверхность трансоблучателя, включить УФ-свет и зарегистрировать флуоресценцию ДНК с помощью фото- или видеозаписи.

B.2.10 Оценка/интерпретация результатов

Оценить содержание ДНК в пробе, сравнивая неизвестные пробы с пробами стандартного образца количества ДНК, которые подвергаются электрофорезу параллельно. Эта оценка может выполняться визуально или с помощью программного обеспечения количественного анализа, пригодного для расчета адекватной калибровочной кривой.

B.3 Метод ПЦР в реальном времени для количественного анализа экстрагированной ДНК

При экстрагировании матриц с низким содержанием ДНК количественный анализ полученной ДНК не всегда возможно провести обычными физическими методами (например, методами, описанными в настоящем приложении) по причине их недостаточной чувствительности. Если необходим такой количественный анализ, то можно использовать метод ПЦР в реальном времени. Этот метод также обеспечивает информацией относительно способности ПЦР к амплификации выделенных молекул ДНК, которую нельзя получить путем выполнения физических измерений концентраций ДНК. Подробности приведены в ISO 21570.

Библиография

[1] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, JG., Smith, JA., Struhl, K.: Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons (1988) (ISBN 0-471-50338-X)
(Современные методы в молекулярной биологии)

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

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

[4] Prokisch, J., Zeleny, R., Trapmann, S., Le Guern, L., Schimmel, H., Kramer, G. N, Pauwels, J. Estimation of the minimum uncertainty of DNA concentration in a genetically modified maize sample candidate certified reference material. Fresenuis J. Analy. Chem. (2001) **370**(7) pp. 935–9
(Оценка минимальной неопределенности измерений концентрации ДНК в пробе генетически модифицированной кукурузы, аттестуемой в качестве стандартного образца)

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

[6] Detection of a genetic modification of Lactobacillus curvatus in uncooked-meat sausage by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 08.00-44 In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods. Federal Health Office, September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
(Обнаружение генетической модификации Lactobacillus curvatus в колбасе из мясного фарша, не подвергнутого тепловой обработке путем амплификации модифицированной последовательности ДНК с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продукта ПЦР с пробой ДНК. L 08.00-44)

[7] Straub, J. A., Hertel, C. and Hammes, W. P. The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. Eur. Food Res. Technol. (1999), pp. 62–67
(Обнаружение рекомбинированной ДНК в колбасах, подвергнутых ферментации и термической обработке)

[8] Straub, J. A., Hertel, C. and Hammes, W. P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of Staphyioccus aureus in meat starter cultures and dairy products. J. Food Protect. (1999) 62, pp. 1150–1156
(Система обнаружения Staphyloccus aureus в заквасочных культурах мясной продукции и в молочной продукции, основанная на обнаружении 23S рДНК путем полимеразной цепной реакции)

[9] Lick, S., Keller, M., Bockelmann, W., Heller, K. J. Optimized DNA extraction method for starter cultures from yoghurt. Milk Sci. Int. (1998) 51, pp. 183–186
(Оптимизированный метод экстрагирования ДНК из заквасочных культур йогурта)

[10] Lick, S., Heller, K. J. Quantitation by PCR of yoghurt starters in a model yoghurt produced with a genetically modified Streptococcus thermophilus. Milk Sci. Int. (1998) 53, pp. 671–675
(Количественное определение методом ПЦР заквасочных культур в йогурте, приготовленном с использованием генетически модифицированного Streptococcus thermophilus)

[11] Detection of a genetic modification of Streptococcus thermophilus in yoghurt by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 02.02-4 In: Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods. Federal Health Office, September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
(Обнаружение генетической модификации Streptococcus thermophilus в йогурте путем амплификации модифицированной последовательности ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации продукта ПЦР с пробой ДНК. L 02.02-4. Сборник официальных методов согласно статье 35 Немецкого федерального закона о пищевой продукции; методы отбора проб и анализа пищевой продукции, табачной продукции, косметики и товаров широкого потребления. Федеральное управление здравоохранения, сентябрь 1998 г., пересмотренная редакция от 05/2001; Берлин, Кельн)

[12] Lick, S., Keller, M., Krusch, U., Heller, K. J. Identification of starter cultures in thermally treated plain yoghurt using geneprobes and PCR. J. Dairy Res. (1998) 63, pp. 607–613
(Идентификация заквасочных культур в обычном йогурте, подвергнутом термической обработке, используя генопробы и ПЦР)

[13] Van Vaerembergh, B., Grootaert, B., Moens, W. Validation of a method for the preparation of fungal genomic DNA for Polymerase chain reaction (PCR) and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). J. Mycol. Mèd. (1995) 5, pp. 133–139
(Валидация метода подготовки геномной ДНК грибков к полимеразной цепной реакции (ПЦР) и случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD)

[14] Haynes, K. A., Westerneng, T. J., Fell, J. W., Moens, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain amplification of large subunit ribosomal DNA. J. Med.& Vet. Mycology (1995) 33, pp. 319–325
(Быстрое обнаружение и идентификация патогенных грибов путем амплификации рибосомной ДНК, состоящей из больших субъединиц, методом полимеразной цепной реакции)

[15] Guillaume, G.: Verbrugge, D., Chasseur-Libotte, M-L., Moens, W., Collard, J-M.: PCR typing of tetracycline determinants (Tet A-E) in Salmonella enterica Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. In: FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32, pp. 77–85
(Типирование определителей тетрациклина (Tet A-E) методом ПЦР в Salmonella enterica Hadar и в микробном сообществе активного ила, отобранного на станциях по очистке сточных вод больниц и городских предприятий Бельгии)

[16] Pedersen, LH., Skouboe, P., Boysen, M., Soule, J., Rossen, L: Detection of Penicillium species in complex food samples using the polymerase chain reaction, Int J Food Microbiol, 1997, 35(2), pp. 169–77
(Обнаружение видов Penicillium в пробах пищевой продукции со сложной матрицей, используя полимеразную цепную реакцию)

[17] Ahn S. J., Costa J., Emanuel J. R. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. Nucleic Acids Res. 1996, 13 pp. 2623–2625
(Количественное определение ДНК. Эффективная оценка проб до и после ПЦР. Нуклеиновые кислоты)

[18] Haugland, R. A., Heckman, J. L., Wymer, L. J. Evaluation of differents methods for the extraction of fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. In: J.Microbiol. Methods, 1999, 37(2), pp. 165–176
(Оценка различных методов экстрагирования конидий грибов путем количественного конкурентного анализа ПЦР)

[19] Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S., and Hyung, N. I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic Acids Research, 1997, 25, No. 5, pp. 1085–1086
(Простой и быстрый метод выделения высококачественной геномной ДНК из плодовых и хвойных деревьев с использованием ПВП)

[20] Berthelet, M., Whyte, L. G., and Greer, C W.: Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. FEMS Microbiology Letters, 1996, 138, pp. 17–22
(Быстрое, прямое экстрагирование ДНК из почв для выполнения анализа ПЦР с использованием вращающейся колонки из поливинилполипирролидона)

[21] Petit, F., Craquelin, S., Guespin-Michel, J., and Buffet-Janvresse, C. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. Res. Microbiol., 1999, 150, pp. 143–151
(Экстрагирование нуклеиновых кислот из загрязненной речной воды для обнаружения вирусов и бактерий путем анализа ПЦР и РТ-ПЦР)

[22] Watson, R. J., and Blackwell, B.: Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can J. Microbiol., 2000, 46, pp. 633–642
(Очистка и охарактеризование общего компонента почв, который ингибирует полимеразную цепную реакцию)

[23] Griffiths, R. J., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., and Bailey, M. J.: Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66, No. 12, pp. 5488–5491
(Экспресс-метод объединенного экстрагирования ДНК и РНК из проб естественной окружающей среды для выполнения анализа состава микробных сообществ на основе метода рибосомной ДНК и рРНК)

[24] Rogers, S. O. and Bendich, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual A6 (1988) pp. 1–10
(Экстрагирование ДНК из ткани растений. Руководство № А 6 по молекулярной биологии растений)

[25] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of soya beans by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 23.01.22-1, March 1998. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgVV). March 1998 Bd. 1 1999-03 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
(Анализ пищевой продукции. Обнаружение генетической модификации сои путем амплификации модифицированной последовательности ДНК, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гибридизацию продукта ПЦР с пробой ДНК. L 23.01.22-1)

[26] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 24.01-01, February 1996, revised in January 1997. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgVV). Jan 1997 Bd. 1 (1997-01 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
(Анализ пищевой продукции. Обнаружение генетической модификации картофеля путем амплификации модифицированной последовательности ДНК, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гибридизацию продукта ПЦР с пробой ДНК. L 24.01.01)

[27] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of tomatoes bean by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 25.03.01-1, November 1999. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/ BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgW). Nov 1999 Bd. 1 (1999-11 Vol. 1) Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH
(Анализ пищевой продукции. Обнаружение генетической модификации помидоров путем амплификации модифицированной последовательности ДНК, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гибридизацию продукта ПЦР с пробой ДНК. L 25.03.01-1)

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

[29] Brodmann, P., Eugster, A., Hubner, Ph., Meyer, R., Pauli, U., Vögeli, U. and Lüthy, J. Nachweis gentechnisch veränderter Roundup Ready™ Sojabohnen mittels der Polymerase – Kettenreaktion (PCR). Methodenvorprüfung im Rahmen der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 1997, **88**, pp. 722–731
(Обнаружение генетически модифицированной сои, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР))

[30] Hübner, P., Studer, E., and Lüthy, J. Quantitative Competitive PCR for the Detection of Genetically Modified in Food. Food Control, 1999, **10**, pp. 353–358
(Количественный конкурентный анализ ПЦР для обнаружения генетически модифицированных организмов в пищевой продукции)

[31] Hübner, P., Studer, E., and Lüthy, J. Quantitation of genetically modified organisms in food. Nat Biotechnol. 1999, **17**, pp. 1137–1138
(Количественная оценка генетически модифицированных организмов в пищевой продукции)

[32] Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B. and Haynes, C. A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. J. Colloid and Interface Science, 1996, **181**, pp. 635–644
(Движущие силы адсорбции ДНК диоксидом кремния в перхлоратных растворах)

[33] Patents: EP 0389063, USP5, 234, 809
(Патенты: EP 0389063, USP5, 234, 809)

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

[35] Swiss Food Manual, Chapter 52B, Section 1 to 5. (2000) Eidgenössische Drucksachen und Materiaizentrale, CH-5005 Bern, available on CD
(Швейцарское пособие по пищевой продукции, глава 52В, разделы 1–5)

[36] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. In: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed., Vol. 5, Appendix 5, (1989) Quantitation of DNA and RNA (ISBN 0-88989-509-8)
(Клонирование молекул нуклеиновых кислот. Лабораторное пособие. Количественная оценка ДНК и РНК)

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

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

[39] ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
(Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[40] ISO 21569:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods
(Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Качественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте)

[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. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот)

[42] ISO Guide 30:2015 Terms and definitions used in connection with reference materials
(Термины и определения, используемые в области стандартных образцов)

[43] ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

[44] Wurz A., Rüggeberg H., Brodmann P., Waiblinger H.-U., Pietsch K. DNA-Extraktionsmethode für den Nachweis gentechnisch veränderter Soja in Sojalecithin [DNA extraction method for the detection of genetically modified soy in soy lecithin]. Dtsch. Lebensm. Rundsch. 1998, **94** pp. 159–161
(Метод экстракции ДНК для определения генетически модифицированной сои в соевом лецитине)

[45] Waiblinger H.-U., Ernst B., Graf N., Pietsch K. Ringtrial validation of a method for the extraction of DNA from soy lecithins. J. Verbrauch. Lebensm. 2007, **2** pp. 113–115
(Утверждение метода экстракции ДНК из соевых лецитинов)

[46] Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure Appl. Chem. 1995, **67**, pp. 331–343
(Протокол разработки, проведения и интерпретации метода исследований эффективности)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии государственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственного стандарта
ISO 21569:2005 Продукты пищевые. Методы анализа на обнаружение генетически модифицированных организмов и их производных продуктов. Качественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте	IDT	ГОСТ ИСО 21569-2009 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы качественного обнаружения на основе анализа нуклеиновых кислот
ISO 21570:2005 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот	IDT	ГОСТ ИСО 21570-2009 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Количественные методы, основанные на нуклеиновой кислоте
ISO 24276:2006 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения	IDT	СТБ ISO 24276-2012 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Общие требования и определения

Ответственный за выпуск *Н. А. Баранов*

Сдано в набор 19.09.2016. Подписано в печать 03.10.2016. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 6,04 Уч.-изд. л. 3,82 Тираж 2 экз. Заказ 1790

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/303 от 22.04.2014
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru