ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ (ЕАСС)

EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION (EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ИСО 21572— 2009

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы, основанные на протеине

(ISO 21572:2004, IDT)

Издание официальное

Зарегистрирован

№ 6010

" 7 " сентября 2010 г.

Минск

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0-92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2-2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Порядок разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) на основе собственного аутентичного перевода стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

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

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004-97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21572:2004 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods (Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы, основанные на протеине).

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

Перевод с английского языка (en).

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

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

Содержание

Введение V
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Принцип 4
5 Реактивы 4
6 Инструменты и оборудование 4
7 Отбор проб 4
8 Процедура анализа 4
9 Интерпретация и представление результатов 5
10 Специфические факторы, которые могут повлиять на результаты 6
11 Подтверждающий метод 7
12 Отчет о результатах 7
Приложение А (обязательное) Определение генетически модифицированных организмов (устойчивых Roundup Ready ®) 8
Библиография 18

Введение

Анализ для выявления генетически модифицированных организмов (ГМО) и их производных может быть выполнен в целях скрининга, качественного или количественного определения ГМО и их производных в заданном материале.

Основной принцип методов анализа, основанных на определении белка, в выявлении компонентов трансгенного происхождения заключается в:

– отборе репрезентативного образца материала;

– экстракции белков;

– определении и/или количественном анализе специфического белка, полученного из ГМО в ходе исследования.

В настоящий стандарт будут включены новые методы анализа по мере их метрологической аттестации и ввода в действие.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ
Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Методы, основанные на протеине

Foodstuffs
Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products.
Protein based methods

Дата введения -

1 Область применения

Настоящий стандарт определяет общие указания и критерии выполнения для методов выявления и/или количественного определения специфических белков, произошедших из генетически модифицированного растительного материала, в определенном материале образца.

Эти общие указания относятся к существующим методам анализа на основе использования антител. Методы, отличные от описанных в приложении А, также могут использоваться для определения белка. Критерии, описанные в настоящем стандарте, имеют общее применение.

2 Нормативные ссылки

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

prEN ISO 21568 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов. Отбор проб

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины и определения.

3.1 Общие термины

3.1.1 образец (sample): Один или несколько элементов выборки, взятых из генеральной совокупности и предназначенных для получения информации о ней.

[ISO 3534-1:1993]

3.1.2 лабораторный образец (laboratory sample): Образец, предназначенный для лабораторной проверки или анализа.

3.1.3 анализируемый образец (анализируемая часть) (test sample (test portion): Образец, подготовленный для проведения испытаний или анализа, который полностью и единовременно используют для проведения испытания или анализа.

[ISO 3534-1:1993]

3.1.4 матрица (материал образца) (matrix): Все компоненты образца и анализируемое вещество. Обычно каждая матрица (материал образца) имеет общеупотребительное название, что позволяет использовать классификацию.

3.1.5 денатурация белков (denaturation of proteins): Физическая и/или химическая, биохимическая обработка, разрушающая или изменяющая структуру анализируемого вещества. Денатурация может изменить структурные, функциональные, ферментативные или антигенные свойства белка.

Издание официальное

3.2 Термины, относящиеся к антителам

3.2.1 антитело (antibody): Белок (иммуноглобулин), производимый и секретируемый В-лимфоцитами в качестве ответа на молекулу, распознанную как чужеродную (антиген). Антитело способно связывать этот специфический антиген.

3.2.2 антиген (antigen): Вещество, распознаваемое иммунной системой как чужеродное и вызывающее иммунный ответ.

3.2.3 клон (clone): Популяция идентичных клеток, произошедших из одной клетки.

3.2.4 перекрестная реактивность (cross-reactivity): Связывание антителом молекул, отличных от молекул основного анализируемого вещества.

3.2.5 моноклональные антитела (monoclonal antibody): Антитела, производимые одним клоном гибридомы и связывающие один антигенный детерминант.

3.2.6 поликлональные антитела (polyclonal antibody): Антитела, производимые несколькими клонами лимфоцитов.

3.2.7 специфичность антитела (specificity of an antibody): Способность антитела специфически связывать антигенный детерминант и не связывать прочие аналогичные структуры на анализируемом или другом антигене.

3.3 Термины, относящиеся к методам

3.3.1 конъюгат (conjugate): Соединение, полученное путем объединения двух или более веществ.

Примечание – Конъюгаты антител с флуорохромами (например, окрашенными частицами), веществами с радиоактивной меткой или ферментами часто используются в иммунологическом анализе.

3.3.2 блоттинг (перенос) по Вестерн (Western blotting): Перенос антигена (т. е. анализируемого белка), с последующим разделением электрофорезом, на связывающую поверхность. Антиген может быть визуализирован с помощью специфических антител, конъюгированных с радиоактивной меткой или ферментом.

3.3.3 твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA – enzyme linked immunosorbent assay): Метод in vitro, в котором используют конъюгированные с ферментом антитела и субстрат, что позволяет при их соединении получить окрашенный продукт реакции. В зависимости от протокола применения, метод может быть использован как для качественного, так и для количественного анализа.

3.3.4 тест-система (test kit): Набор химических реактивов, материалов и руководств по их использованию, собранный в одну упаковку и предназначенный для проведения измерения in vitro с целью обнаружения специфического анализируемого вещества.

3.3.5 погружаемая полоска (dip stick format): Погружаемые полоски для качественного экспресс-анализа представляют собой полоски с боковым протеканием реактивов, в которых антитело или анализируемый материал иммобилизованы на твердой фазе.

3.4 Термины, относящиеся к контролю

3.4.1 стандартный образец (reference material): Материал или вещество, одно или более свойств которого однородны и точно установлены для калибровки оборудования, оценки метода измерения или для установки значений для анализируемых веществ.

[ISO Guide 30]

3.4.2 эталон (standard): Мера физической величины, измерительное оборудование, стандартный образец или измерительная система, предназначенные для определения, оценки, сохранения или воспроизведения единицы одного или более количественных значений величин, используемые в качестве стандарта или для воспроизведения известных характеристик при стандартизации анализа.

3.5 Термины, относящиеся к валидации (метрологической аттестации)

3.5.1 точность (результата измерений) (accuracy): Близость результата измерений к принятому эталонному значению величины.

Примечание – Термин «точность», когда его относят к серии результатов измерений, включает в себя комбинацию случайных компонентов и общего компонента систематической ошибки или смещения.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.2 прецизионность (результата измерений) (precision): Близость между независимыми результатами измерений, полученными при определенных принятых условиях.

Примечание – Прецизионность зависит только от распределения случайных ошибок и не связана ни с истинным значением, ни с заданным значением.

Примечание – Показатель прецизионности обычно выражают в терминах рассеяния и вычисляют как стандартное отклонение результатов измерений. Малой прецизионности соответствует большее стандартное отклонение.

Примечание – Независимые результаты измерений означают результаты, полученные таким образом, что отсутствует влияние предыдущих результатов на том же самом или аналогичном объекте измерений. Количественные показатели прецизионности существенно зависят от принятых условий. Условия повторяемости и воспроизводимости являются совокупностями предельных условий, представляющими собой частный случай.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.3 смещение (bias): Разность между математическим ожиданием результатов измерений и принятым эталонным значением.

3.5.4 чувствительность (sensitivity): Способность обнаружения малых отличий концентрации вещества в исследуемом материале.

В этом контексте под чувствительностью обычно понимают наименьшее количество (концентрацию) анализируемого вещества, результат измерения которого может достоверно отличаться от фонового значения.

3.5.5 специфичность (specificity): Свойство метода отвечать исключительно на характеристику анализируемого вещества, определенную в кодексе стандартов.

3.5.6 предел обнаружения (для качественного метода) (limit of detection (LOD): Под пределом обнаружения для качественного метода понимают наименьшую концентрацию или содержание анализируемого вещества, которые могут быть достоверно определены, но без необходимости получения количественного значения. Предел обнаружения определяют в ходе проведенных должным образом совместных исследований или внутрилабораторной метрологической аттестации [1], [2].

3.5.7 предел измерения (для количественного метода) (limit of quantitation (LOQ): Под пределом измерения для количественного метода для аналитической процедуры понимают наименьшую концентрацию или содержание анализируемого вещества в образце, которая может быть определена количественно с допустимым уровнем прецизионности и точности и подтверждена результатами проведенных должным образом совместных исследований или внутрилабораторной метрологической аттестации в соответствии с требованиями ISO 5725, [2] или [3].

3.5.8 диапазон применения (диапазон количественного анализа/линейности/динамический диапазон) (applicability range (range of quantification/linearity/dynamic range): Верхний и нижний пределы в количественном анализе, выраженные по набору стандартного образца (или разведений).

3.5.9 предел повторяемости [воспроизводимости] (repeatability [reproducibility] limit): Такое значение, при котором абсолютная разность между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости, будет ожидаться меньше его или равной ему с вероятностью 95 %.

Примечание – Используемое условное обозначение r [R].

[ISO 3534-1]

При анализе результатов двух единичных измерений, полученных в условиях повторяемости [воспроизводимости], сравнение следует проводить с пределом повторяемости [воспроизводимости] r [R] = 2,8 s_r [s_R].

3.5.10 воспроизводимость (reproducibility): Прецизионность в условиях воспроизводимости.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.11 условия воспроизводимости (reproducibility conditions): Условия, при которых результаты измерений получены одним методом на идентичных испытательных образцах в различных лабораториях разными операторами с использованием различного оборудования.

3.5.12 повторяемость (repeatability): Прецизионность в условиях повторяемости.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.13 условия повторяемости (repeatability conditions): Условия, при которых независимые результаты измерений получены одним методом на идентичных анализируемых образцах в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования и за короткий интервал времени.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.14 стандартное отклонение повторяемости [воспроизводимости] (repeatability [reproducibility] standard deviation): Стандартное отклонение результатов измерений, полученных в условиях повторяемости [воспроизводимости].

Примечание – Стандартное отклонение повторяемости [воспроизводимости] является мерой рассеяния в распределении результатов измерений, полученных в условиях повторяемости [воспроизводимости]. Аналогично можно определить и использовать в качестве меры рассеяния в распределении результатов измерений, полученных в условиях повторяемости [воспроизводимости], термины «отклонение повторяемости [воспроизводи-мости]» и «коэффициент вариации повторяемости [воспроизводимости]».

3.5.15 восстанавливаемость (recovery): Способность измерить или получить на выходе известное количество анализируемого вещества в обогащенных образцах в пределах диапазона количественного анализа.

4 Принцип

Искомый белок экстрагируется в соответствии с процедурой, описанной для конкретной специфической матрицы. Для определения или измерения концентрации белка в образце используется специфическое антитело.

5 Реактивы

Если это не оговаривается особо, используются при анализе только реактивы с известной аналитической степенью чистоты и только деионизованная и дистиллированная вода или вода, прошедшая очистку, или ее эквивалент.

Прочие реактивы, то есть антитела, конъюгаты, субстрат, стоп-растворы и компоненты буферных растворов, являются специфическими для данного метода. Необходимо обязательно изучить методику для получения дополнительной информации по специфическим реактивам, таким как стандартные образцы белка или стандартные образцы известного состава, антитела, иммобилизованные на твердой фазе или в свободном состоянии, контрольные и анализируемые образцы.

6 Инструменты и оборудование

Используемые инструменты и оборудование определены в А.5.

7 Отбор проб

Отбор проб подробно описан в prEN ISO 21568.

8 Процедура анализа

8.1 Общие положения

Условия хранения и срок годности антител, конъюгата, субстрата и других реактивов и материалов должны быть указаны поставщиком.

Для использования настоящего стандарта в испытательных лабораториях должны соблюдаться общие требования контроля качества (например, касающиеся калибровки оборудования, измерения с повторами, использования отрицательных контрольных образцов, стандартных образцов, построения калибровочных кривых и т. д.), должна быть проведена тщательная очистка всего оборудования, имевшего прямой контакт с образцом для предотвращения контаминации.

Для предотвращения абсорбции белка в процессе анализа необходимо использовать только соответствующее лабораторное оборудование с низкой способностью связывания белка (например, полипропиленовые пробирки).

8.2 Приготовление раствора образца

Приготовление раствора проводится сразу после отбора репрезентативного образца. Специфические протоколы приготовления растворов образцов приводятся в приложении А.

При необходимости перед отбором для анализа образцы измельчаются в соответствии с рекомендациями метода. Порошок/мука обладают свойством набухания, поэтому для этих материалов может потребоваться двойной объем раствора для экстракции.

Лабораторные образцы, содержащие большое количество жира, могут быть негомогенными. В этом случае следует отбирать для экстракции больший объем образца. Соответствующее руководство приводится в приложении А.

Необходимо взвесить достаточное количество (определено в приложении А) лабораторного образца с целью получения необходимого количества анализируемого образца, из которого будет проводиться экстракция. Добавить раствор для экстракции, гомогенизировать или размешать.

8.3 Экстракция

Необходимо использовать процедуру экстракции, соответствующую типу материала образца. Условия экстракции/разведения образцов для анализа, контрольных образцов и стандартных образцов, имеющих разные типы матриц, подробно описаны в приложении А.

Необходимо применять процедуры экстракции, прошедшие метрологическую аттестацию для данного материала образца. При необходимости используются связывающие агенты или специальные буферные растворы для улучшения экстракции белка (например, при анализе горького шоколада рекомендуется добавлять связывающий раствор танина).

8.4 Расчет калибровочных кривых

Для расчета калибровочных кривых рекомендуется использовать стандартные образцы с совпадающей матрицей образца или стандартные образцы, прошедшие метрологическую аттестацию для данной матрицы.

8.5 Процедура анализа

В соответствии с процедурой анализа, выбранной согласно приложению А настоящего стандарта, необходимо отобрать требуемое число стрипов/тестов для анализируемых образцов, включая пустые образцы, стандартные образцы, контрольные образцы, а затем внести растворы образцов, стандартов и т. д., подготовленные для анализа, не менее чем в двух повторностях.

В соответствии с выбранным методом необходимо осторожно и тщательно перемешать образцы и провести реакции в заданных условиях (время и температурные условия). При необходимости следует остановить реакцию, следуя методу, описанному в приложении А.

Стабильность конечного результата может варьироваться. Необходимо своевременно регистрировать результаты, как указано в приложении А.

9 Интерпретация и представление результатов

9.1 Общие положения

Интерпретируемые показатели могут варьироваться в зависимости от того, был ли использованный метод качественным, полуколичественным или количественным.

Для количественных методов коэффициент вариации значений оптической плотности, полученных при измерении повторов анализируемого образца, в целом не должен превышать 15 %. Коэффициент вариации для концентраций, рассчитанных по измерению повторов анализируемого образца, в целом не должен превышать 20 %.

Если превышено предельное значение коэффициента вариации, исследование необходимо повторить на заново подготовленном растворе анализируемого образца. Для определения коэффициента вариации в этом случае следует провести как минимум три определения (например, использовать три лунки стрипа микропланшета для одного образца).

Не следует выдавать заключение об отсутствии ГМО в исследованном образце. Отрицательные результаты следует интерпретировать как «отрицательный результат с данным пределом обнаружения» или «результат менее предела обнаружения».

Положительные результаты со значениями ниже предела измерения для количественного анализа следует интерпретировать как «положительный результат со значением выше предела обнаружения, но ниже предела измерения».

9.2 Количественный и полуколичественный анализ

В исследовании необходимо определить следующие параметры: исходные значения (текущие цифровые значения) для растворов анализируемого образца, пустого образца, стандартного образца или аналитического стандартного образца, а также отрицательного контрольного образца, коэффициент вариации (в процентах) между повторами, коэффициент вариации (в процентах) между повторами для стандартов и коэффициент вариации (в процентах) для контрольных образцов.

В отчет с окончательными результатами следует включать предварительно полученную оценку точностных характеристик или неопределенность результата измерения.

Не следует включать в отчет результаты количественного анализа, полученные путем экстраполяции калибровочной кривой выше или ниже значений для стандартов максимальной и минимальной концентрации соответственно.

9.3 Качественный анализ

Параметры, определяемые при качественном анализе, включая все перечисленные здесь методы, описаны в приложении А.

Результаты следует представлять в виде «обнаружено» или «не обнаружено» с указанием предела обнаружения.

10 Специфические факторы, которые могут повлиять на результаты

10.1 Общие положения

Критерии эффективности, перечисленные в методе из приложения А, – это подборка характеристик эффективности, полученная для каждого метода при его разработке, метрологической аттестации и обычном использовании. Эти параметры получены для каждого метода и позволяют подтвердить достоверность полученных с помощью метода данных, а также судить о качестве анализа. Каждый раз при работе определенным методом необходимо вычислить критерии эффективности метода и сравнить их значения с установленными.

Если полученное значение (например, коэффициент вариации повторных измерений) не соответствует параметрам метода, это означает, что полученный результат нестандартен и требует дополнительного анализа данных. Перечень этих параметров следует рассматривать в целом, т. е., если при определенных обстоятельствах отдельные параметры не соответствуют установленным значениям, результаты все равно могут быть учтены в целом. Тем не менее при несоответствии некоторых критериев установленным значениям следует указать это в отчете, а также определить, следует ли провести корректировку полученных данных или повторить исследование одного или нескольких образцов. Такие решения должны приниматься на основе заключения исследователя, анализирующего все критерии.

10.2 Особые примечания

10.2.1 Специфичность

Для каждого анализируемого вещества (белок) и для каждого исследуемого материала образца необходимо показать достаточную специфичность метода. Следует по возможности оценить перекрестную реактивность с аналогами анализируемого вещества (белков со сходной последовательностью). Для подтверждения отсутствия анализируемого вещества в генетически не модифицированном продукте, необходимо провести исследование образцов, содержащих и не содержащих ГМО в должных разведениях, а затем сравнить результаты.

Как правило, эти проверки осуществляются в процессе разработки и метрологической аттестации метода, поэтому нет необходимости их выполнения при обычном исследовании образцов методом, прошедшим метрологическую аттестацию. Метод в приложении А перечисляет все специфические вещества и материалы, для которых определена перекрестная реактивность.

10.2.2 Эффективность экстракции

Необходимо уделить особенное внимание оценке влияния параметров процессов, использованных в приготовлении конкретного лабораторного образца.

Для обеспечения максимальной чувствительности иммунологического анализа эффективность экстракции должна быть наивысшей. Эффективность анализа зависит от материала исследуемого образца. Поэтому для каждого материала следует определить и документировать эффективность экстракции.

Следует доказать воспроизводимость процедуры экстракции и представить метод расчета калибровочной кривой при неполной экстракции.

10.2.3 Эффект матрицы образца

Область применения метода однозначно и точно определяет матрицы, для которых допустимо применение данного метода иммунологического анализа. Использование стандартных образцов с соответствующей матрицей позволяет производить непосредственное сравнение между стандартными образцами и исследуемыми образцами.

Оценка эффекта матрицы осуществляется следующим образом.

Необходимо приготовить для исследования конкретным методом экстракты образцов из матрицы каждого типа, не содержащих ГМО, и экстракт положительного контрольного образца с известной концентрацией. Приготовить серию разведений положительного контрольного образца в экстракте

отрицательного контрольного образца. Сравнить полученные кривые (концентрация/отклик) с калибровочной кривой метода. Если эти кривые отличаются, имеет место эффект матрицы. Необходимо использовать материал стандартов, наиболее точно воспроизводящий матрицу исследуемых образцов. Кривая разведений положительного контрольного образца известной концентрации тоже должна учитываться при интерпретации данных в качестве опорной информации. Форма калибровочной кривой не должна изменяться из-за эффекта матрицы.

10.2.4 Параллельность/линейность

Для количественного анализа ожидаемый диапазон линейности иммунологического анализа должен быть четко представлен в области применения метода для каждой анализируемой матрицы.

Число точек калибровочной кривой, входящей в документацию метода, должно отражать ее линейную часть (т. е., если калибровочная кривая нелинейная, требуется большее число точек).

Если калибровочные кривые «непараллельные» или отличаются по углу наклона при построении на одном графике, следует провести статистическую обработку данных на предмет определения корректности разведений.

10.2.5 Предел обнаружения

Не следует принимать в расчет результаты, лежащие ниже предела обнаружения. В случае получения таких значений в отчете следует указывать «результат ниже или равен пределу обнаружения».

10.2.6 Предел измерения при количественном анализе

Следует четко определить предел измерения при количественном анализе для каждой серии калибровочных стандартов (или разведений).

Предполагаемая концентрация в анализируемом экстракте исследуемого образца должна быть получена путем интерполяции, но не экстраполяции значений калибровочных стандартов.

Не следует принимать в расчет результаты, значения которых лежат ниже предела измерения или вне диапазона концентраций калибровочных стандартов.

11 Подтверждающий метод

Для оценки достоверности метода можно провести измерение аналитического образца, разделенного на несколько порций, с помощью других аналитических методов, например переноса по Вестерну, ВЭЖХ, или функциональных методов. Результаты, полученные разными методами, затем сравниваются качественно или количественно. Это особенно важно для методов иммунологического анализа, так как антитела могут проявлять перекрестную специфичность к другим соединениям, присутствующим в матрице.

12 Отчет о результатах

Отчет о результатах должен содержать по крайней мере следующие данные:

– вся информация, необходимая для идентификации лабораторного образца;

– ссылка на настоящий стандарт и на используемый метод анализа, а также пометка о том, был ли анализ качественный, количественный или полуколичественный;

– предел обнаружения;

– верхняя и нижняя границы диапазона измерения количественного анализа;

– дата и тип используемой процедуры пробоподготовки (если она известна);

– дата приема образца;

– дата начала проведения анализа или другая информация такого рода;

– объем анализируемого образца;

– объем экстракта исследуемого образца;

– результаты и единицы измерения, использованные в отчете о результатах;

– информация о любых специфических ситуациях, произошедших во время исследования;

– любое действие, не описанное в методе или рассматриваемое как дополнительное, но, возможно, оказывающее эффект на результаты анализа.

Приложение А
(обязательное)

Определение генетически модифицированных организмов (устойчивых Roundup Ready® [1])

А.1 Введение

Соевые бобы (*Glycine max*) являются важным сырьем для пищевой продукции и кормов [2]. Недавно ген cp4 epsps был введен в геном определенных сортов сои с использованием современной биотехнологии. Ген устойчивости к глифосатным гербицидам получен из линии CP4 *Agrobacterium sp.* Экспрессируемый белок CP4 EPSPS обеспечивает устойчивость к глифосатным гербицидам (Roundup® [1]). Производимый в организме сои белок CP4 EPSPS может быть обнаружен с помощью специфических антител.

А.2 Область применения

Это приложение определяет протокол иммунологического анализа типа ELISA для определения белка CP4 EPSPS в соевых бобах Roundup Ready® [1] линии GTS 40-3-2 и в произведенных из них ингредиентах.

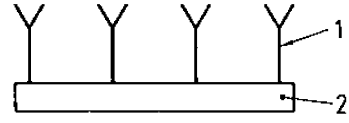
Метод применим для анализа образцов, не подвергшихся или прошедших минимальную температурную обработку, в процессе которой белок CP4 EPSPS не денатурировал. Например, температура, при которой происходит приготовление компонентов пищи, способна существенно снизить возможность обнаружения искомого белка.

В случае проведения количественного анализа метод можно применять только для образцов, состоящих исключительно из соевых бобов или их производных.

Метод прошел метрологическую аттестацию по определению белка CP4 EPSPS в соевой муке (стандартный образец IRMM) и может быть использован для анализа образцов с содержанием этого белка от 0,5 до 2 % (в/в) с применением специальных стандартных образцов [3]. На рынке представлена тест-система [4] на основе описываемого метода, предназначенная для анализа других содержащих белок матриц, в соответствии с методикой производителя. Информация по совместным исследованиям и руководству по эксплуатации приведена в [3], [4].

А.3 Принцип метода

Для обнаружения белка CP4 EPSPS используется прямой твердофазный иммуноферментный анализ ELISA типа «сэндвич». На рисунках А.1 – А.4 показан принцип метода:



1 – моноклональные антитела;
2 – покрытая антителами поверхность

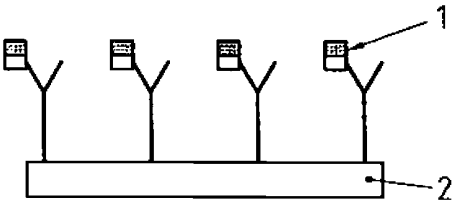
Рисунок А.1 – Поверхность микропланшета покрыта специфическими моноклональными антителами для захвата антигена

[1] Roundup Ready® и Roundup® являются зарегистрированными торговыми марками компании Monsanto. Эта информация приводится только с целью ознакомления читателя и не является одобрением CEN.

[2] Обычные компоненты пищевой продукции и кормов, имеющие высокое содержание белка: мука, концентрат, изолят и текстурат.

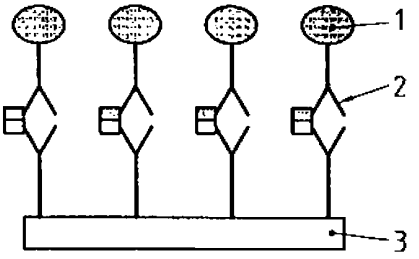
[3] Стандартные образцы, пригодные для использования в этом методе, можно заказать в Институте стандартных образцов Объединенного исследовательского центра Европейской комиссии (IRMM JRC). Эта информация приводится только для ознакомления пользователей настоящего стандарта и не является официальной рекомендацией или одобрением использования этого продукта.

[4] Strategic Diagnostics, Inc, Хэмпшир, Великобритания. Эта информация приводится только для ознакомления пользователей настоящего стандарта и не является официальной рекомендацией или одобрением использования этого продукта.



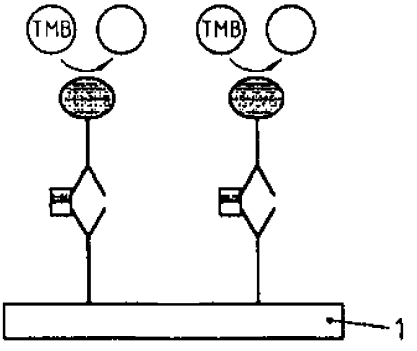
1 – антиген;
2 – покрытая антителами поверхность

Рисунок А.2 – При добавлении в лунку микропланшета анализируемого образца захватывающее антитело связывает антиген. Несвязанные компоненты образца удаляются при промыве микропланшета



1 – пероксидаза хрена;
2 – проявляющее антитело;
3 – покрытая антителами поверхность

Рисунок А.3 – После промывки в лунки микропланшета добавляют поликлональные антитела, ковалентно связанные с пероксидазой хрена. Эти антитела специфичны ко второму антигенному детерминанту связанного белка CP4 EPSPS



1 – покрытая антителами поверхность

Рисунок А.4 – После промывки в лунки микропланшета добавляют тетраметилбензидин (ТМБ), хромогенный субстрат для пероксидазы хрена. Пероксидаза хрена ферментирует субстрат, что приводит к образованию окрашенного продукта. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антигена в линейном диапазоне. Для остановки цветной реакции добавляют стоп-раствор. Интенсивность сформировавшейся окраски измеряют спектрофотометрически при длине волны 450 нм

А.4 Реактивы

А.4.1 Общие положения

Если специально не оговорено, необходимо использовать для анализа реактивы только с определенной (известной) степенью чистоты и деионизованную или дистиллированную воду.

Любое отклонение от рассчитанных критериев производительности может означать нарушение стабильности реактива. Если компоненты субстрата изменили цвет с прозрачного на синий, этот реактив следует выбросить. Нельзя использовать помутневшие буферный раствор и раствор конъюгата.

Все компоненты тест-системы следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок хранения тест-системы обозначен датой истечения ее годности. На основе ускоренного исследования стабильности срок годности тест-системы установлен на 9 мес при соблюдении правил хранения (см. выше).

Концентрированный (А.6.6.1) и рабочий (А.6.6.2) растворы конъюгата антител с ферментом следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности. Разведенный буферный раствор для промывки должен храниться при температуре приблизительно от 2 °С до 8 °С и не дольше срока годности тест-системы.

А.4.2 Реактивы, обычно входящие в комплект тест-системы

А.4.2.1 Буферный раствор для экстракции из сои, натрий-боратный буфер, pH 7,5.

А.4.2.2 Рабочий буферный раствор для сои, PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), Tween 20, бычий сывороточный альбумин, pH 7,4.

А.4.2.3 Стрипованный микропланшет, лунки которого покрыты антителами, 12 стрипов по 8 лунок в каждом (лунки покрыты антителами); держатель стрипов.

А.4.2.4 Кроличьи антитела против CP4-EPSPS, конъюгированные с пероксидазой хрена, лиофилизированные.

А.4.2.5 Буферный раствор для разведения конъюгата, 10%-ная инактивированная нагревом сыворотка крови мыши.

А.4.2.6 Хромогенный субстрат, K-blue™ [5] (тетраметилбензидин (ТМБ), перекись водорода, 5%-ный диметилформамид в качестве основного растворителя).

А.4.2.7 Стоп-раствор, 0,5%-ная серная кислота.

А.4.2.8 10-кратный концентрированный буферный раствор для промывки, PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), Tween 20, pH 7,1.

А.4.2.9 Отрицательные и положительные стандартные образцы с соответствующей матрицей, например, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % и 5 %.

А.4.3 Реактивы, не входящие в комплект тест-системы

А.4.3.1 Спирт, например метиловый (концентрация 70 % по объему) или этиловый (концентрация 95 % по объему).

А.4.3.2 Детергент, для ультразвуковой бани, необязательно.

А.5 Инструменты и оборудование

А.5.1 Общие положения

Обычное лабораторное оборудование и в частности:

А.5.2 Холодильник, обеспечивающий температуру приблизительно 4 °С.

А.5.3 Полипропиленовые пробирки для центрифуги, с коническим дном, с крышкой, например, на 15 мл.

А.5.4 Самоклеящаяся пленка для микропланшетов, пластиковая или алюминиевая.

А.5.5 Пластиковая лента для закрепления стрипов в процессе промывания микропланшетов.

А.5.6 Бутыль для промывки, например, на 500 мл.

А.5.7 Прецизионные автоматические пипетки, с переменным объемом, например, 20 – 500 мкл.

---

[5] K-blue – это торговая марка продукта, поставляемого корпорацией Neogen, Лэнсинг, Мичиган, США. Эта информация приводится только для ознакомления пользователей настоящего стандарта и не является официальной рекомендацией или одобрением CEN по использованию этого продукта. Допускается использование аналогичных реактивов, если они позволяют получить такие же результаты.

А.5.8 Встряхиватель, например Vortex® [6].

А.5.9 Лабораторные весы, с пределом взвешивания 0,01 г.

А.5.10 Центрифуга, с ускорением не менее 5 000 × *g* на дне центрифужной пробирки.

А.5.11 Планшетный спектрофотометр, способный регистрировать поглощение на длине волны 450 нм.

А.5.12 Суховоздушный инкубатор или водяная баня, способные поддерживать температуру 37 °С.

А.5.13 Сито с размером ячейки 450 мкм или аналогичное.

А.5.14 Сито с размером ячейки 150 мкм (100 меш) или аналогичное.

А.5.15 Многоканальная автоматическая пипетка, например, для объемов 50 – 300 мкл (необязательно).

А.5.16 Ванночки для реактивов для использования с многоканальной пипеткой (необязательно).

А.5.17 Автоматический промыватель планшетов (необязательно).

А.5.18 Штатив для центрифужных пробирок на 15 мл (необязательно).

А.5.19 Ультразвуковая баня (необязательно).

А.6 Процедура

А.6.1 Меры предосторожности

Следует соблюдать меры предосторожности при работе с растворами кислот или тетраметилбензидина.

Достаточно естественной вентиляции.

А.6.2 Ограничения процедуры

Анализ типа ELISA следует применять для образцов, в которых содержание белка CP4 EPSPS коррелирует с уровнем присутствия генетически модифицированного материала в используемом стандартном образце. Для образцов, прошедших термическую обработку, или пищевой продукции сложного состава такая корреляция может отсутствовать.

Тест-система на основе метода ELISA разработана для получения оптимальной производительности при комнатной температуре в диапазоне от 15 °С до 30 °С. Поглощение образца известного состава должно превышать 0,8 единиц оптической плотности (OD) и не должно выпадать за пределы диапазона линейности измерения спектрофотометра (верхнее предельное значение у разных моделей спектрофотометров отличается). При температурах выше 30 °С значения оптической плотности будут возрастать быстрее; при этом, возможно, потребуется сократить время инкубации с субстратом. При низких температурах (ниже 15 °С) следует увеличить время инкубации с субстратом.

А.6.3 Отбор проб

Отбор проб следует проводить в соответствии с требованиями prEN ISO 21568.

А.6.4 Пробоподготовка

Из гомогенного лабораторного образца отбирается анализируемый образец в достаточном количестве для проведения анализа в повторе по prEN ISO 21568.

При анализе необработанных соевых бобов рекомендуется отобрать 2 000 г образца и измельчить достаточно мелко, чтобы полученные частицы могли пройти через сито. Размер частицы не должен превышать 150 мкм для проведения количественного анализа и 450 мкм – для качественного. Для предотвращения перекрестной контаминации этап просеивания следует проводить с особой тщательностью. Не допускать чрезмерного нагрева образца! Для одновременного размешивания и измельчения образца можно использовать блендер. При работе с твердым материалом образцов (целые соевые бобы) следует отобрать около 100 г, измельчить и просеять через сито с размером ячейки 450 мкм (А.5.13). При просеивании через сито с размером ячейки 450 мкм должно пройти не менее 90 % образца. При проведении качественного анализа полученный материал можно использовать напрямую. Если требуется провести количественный анализ, то полученный материал следует просеять через сито с размером ячейки 150 мкм (А.5.14). Считается, что материал, просеянный через сито с размером

---

[6] Vortex – это пример коммерчески доступного встряхивателя, пригодного для использования с описываемым методом. Эта информация приводится только для ознакомления пользователей настоящего стандарта и не является официальной рекомендацией или одобрением CEN по использованию этого продукта.

ячейки 450 мкм, является гомогенным. Поэтому следует просеивать через сито с размером ячейки 150 мкм только количество материала, необходимое для получения анализируемого образца.

Другие типы образцов должны проходить аналогичную процедуру пробоподготовки, допускается использование меньшего объема образца.

А.6.5 Меры по предотвращению перекрестной контаминации при пробоподготовке

А.6.5.1 Общие положения

Тест-система на основе метода ELISA представляет собой чувствительную методику, позволяющую определять очень низкие концентрации белка CP4 EPSPS. Поэтому тщательная очистка всего оборудования, использованного при работе с образцами сои, между пробоподготовкой разных групп образцов является необходимой. Рекомендуемая процедура включает в себя первый этап физического удаления максимально возможного количества частиц материала, второй этап, заключающийся в промывке спиртом, предназначен для денатурации и получения неактивного состояния всех белков, оставшихся в оборудовании.

А.6.5.2 Очистка блендера или мельницы

Необходимо проводить очистку щеткой с мягким ворсом.

Необходимо промывать спиртом не менее двух раз (спирт можно хранить в распылителе или промывочной бутыли, из которых удобно проводить обработку). Затем тщательно промыть водой.

Дать просохнуть на воздухе или, если необходимо скорое повторное использование оборудования, воспользоваться бытовым феном для сушки волос.

Необходимо периодически мыть щетку и замачивать ее в растворе спирта (А.4.3.1). Обязательно высушить щетку перед повторным использованием, протереть лоскутом мягкой ткани или лабораторной салфеткой.

А.6.5.3 Очистка сита

Сито может забиваться порошком сои. Для удаления осевшего материала необходимо сильно выколотить сито о твердую поверхность, прочистить щеткой с мягким ворсом, замочить сито в спирте не менее чем на 5 мин, а затем тщательно промыть водой. Дать просохнуть на воздухе или, если необходимо скорое повторное использование сита, воспользоваться бытовым феном для сушки волос.

В качестве альтернативного метода можно использовать ультразвуковую баню с последующей просушкой на воздухе.

Необходимо периодически мыть щетку и замачивать ее в растворе спирта (А.4.3.1) не менее чем на 1 мин. Высушить щетку перед повторным использованием, протереть лоскутом мягкой ткани или лабораторной салфеткой.

А.6.5.4 Очистка рабочего места

Необходимо избегать загрязнения рабочего места соевой пылью. Не допускать попадания соевой пыли, образовавшейся в ходе пробоподготовки одной группы образцов, в оборудование, которое будет использоваться при пробоподготовке следующих групп. Для оптимальной производительности необходимо проводить анализ в отдельном помещении. Для предотвращения возможной контаминации соевой пылью измельчение образца и пробоподготовку следует проводить в отдельном помещении.

А.6.6 Приготовление конъюгата антител

А.6.6.1 Основной раствор конъюгата антител

Растворить лиофилизированный конъюгат (А.4.2.4) в буферном растворе для разведения конъюгата (А.4.2.5) в соответствии с руководством пользователя.

Хранить основной раствор конъюгата антител при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности тест-системы.

А.6.6.2 Рабочий раствор конъюгата антител

Добавить 240 мкл основного раствора конъюгата антител (А.6.6.1) к 21 мл буферного раствора для разведения конъюгата (А.4.2.5).

Хранить рабочий раствор конъюгата антител при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности тест-системы.

А.6.7 Приготовление буферного раствора для промывки

Развести в 10 раз концентрированный раствор буферного раствора для промывки (А.4.2.8) в воде (т. е. одна часть концентрированного раствора плюс девять частей воды).

А.6.8 Процедура анализа

Перед проведением анализа все используемые реактивы должны быть нагреты до комнатной температуры.

Достать стрипы с нанесенными антителами (А.4.2.3) и держатель стрипов из фольгированного пакета. Каждый раз, когда достается необходимое количество стрипов и держатель, необходимо запечатывать пакет. Для стандартов известного состава и отрицательных стандартов требуется десять лунок. Для каждого микропланшета следует использовать собственные стандартные и контрольные образцы. При промывании планшета вручную необходимо приклеить клейкой лентой края используемых стрипов к держателю для предотвращения их случайного выпадения в процессе промывания.

Схема процедуры анализа приводится в А.7.

А.6.9 Проведение анализа

А.6.9.1 Экстракция из анализируемой части образца и из стандартных образцов

Экстракция из анализируемых образцов (анализируемых частей), отрицательных и положительных контрольных стандартных образцов [7)] проводится в одинаковых условиях в повторах в соответствии со следующим описанием.

Взвесить (0,5 ± 0,01) г каждого стандартного образца и анализируемого образца в отдельные полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 15 мл. Взвешивание стандартных образцов проводится в порядке увеличения концентрации анализируемого вещества в них. Затем взять навески анализируемых образцов. Для предотвращения контаминации использовать очищенные шпатели (протереть шпатель лоскутом ткани, смоченным в спирте (А.4.3.1), а затем просушить) или одноразовые шпатели для каждого стандартного образца и анализируемого образца.

Добавить 4,5 мл буферного раствора для экстракции (А.4.2.1) в каждую центрифужную пробирку.

Размешать анализируемую часть образца или стандартный образец в буферном растворе для экстракции путем сильного встряхивания и взбалтывания (на вортексе) до образования гомогенной смеси.

Примечание – Смешивание обезжиренной соевой муки и изолята соевого белка с буферным раствором для экстракции занимает продолжительный промежуток времени, зачастую превышающий 15 мин. Соевая мука с полным содержанием жира гораздо быстрее образует гомогенную смесь (менее чем за 5 мин).

Провести центрифугирование полученных смесей при приблизительно 5 000 *g* * в течение 15 мин при 4 °С.

Аккуратно отобрать примерно по 1 мл супернатанта из каждого раствора образца и стандарта и перенести в отдельные чистые полипропиленовые центрифужные пробирки.

Растворы образцов можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С, но не более одного рабочего дня.

Перед проведением анализа развести растворы исследуемых и стандартных образцов в рабочем буферном растворе для сои (А.4.2.2) в соответствии с таблицей А.1

Таблица А.1 – Коэффициенты разведения для разных матриц

Матрица	Разведение
Соевые бобы	1 : 300
Соевая мука	1 : 300
Обезжиренная соевая мука [a]	1 : 300
Изолят соевого белка [a]	1 : 10
[a] Для этих матриц не проводилась метрологическая оценка в совместных исследованиях. Приведенное значение разведения основывается на опыте производителя.	

[7)] Доступные в настоящий момент на рынке стандартные образцы можно заказать в Институте стандартных образцов и измерений, Объединенный центр исследований (JRC), Гиль, Бельгия. Эта информация приводится только для ознакомления пользователей настоящего стандарта и не является официальной рекомендацией или одобрением CEN по использованию этого продукта.

* $g = 9{,}8$ м/с^2.

Схема процедуры экстракции приводится в таблице А.2

А.6.9.2 Процедура иммунологического анализа ELISA

А.6.9.2.1 Общие положения

Анализ на основе метода ELISA можно проводить в различных форматах, используют любое количество 8-луночных стрипов. Рекомендуется использовать схему случайного заполнения лунок микропланшета, т. е. не вносить анализируемые и стандартные образцы в одни и те же лунки при каждом анализе, что позволит исключить эффект положения лунки в стрипе (если таковой имеется).

Все реакции следует проводить как минимум в двух повторностях для каждого анализируемого или стандартного образца и рассчитывать среднее значение поглощения. Каждый анализ необходимо проводить с растворами для отрицательного контроля метода, отрицательного и положительного стандартных образцов.

Начав процедуру анализа, следует выполнить все этапы без прерывания работы.

Схема проведения иммунологического анализа ELISA приводится в таблице А.3.

А.6.9.2.2 Инкубация

Используя автоматическую микропипетку, внести по 100 мкл разведенных растворов исследуемых и стандартных образцов, а также контрольную пробу для метода в соответствующие лунки. Для предотвращения перекрестной контаминации использовать отдельные одноразовые наконечники для пипетки при каждом шаге ее использования. Накрыть планшет пластиковой или алюминиевой пленкой (А.5.4) для предотвращения контаминации и испарения.

Перед началом инкубации рекомендуется осторожно встряхнуть микропланшет с целью перемешивания его содержимого. Для этого необходимо взяться за короткие стороны микропланшета указательным и большим пальцами и подвигать его из стороны в сторону.

Инкубировать микропланшет при 37 °С в течение 1 ч.

А.6.9.2.3 Промывание микропланшета

Промыть микропланшет три раза буферным раствором для промывки (А.6.7) (по 300 мкл в каждую лунку), используя встряхиватель (А.5.8).

Промывание микропланшета вручную: Опорожнить лунки, перевернув планшет над раковиной или подходящей емкостью для отходов. Заполнить каждую лунку доверху, используя бутыль для промывания вместимостью 500 мл, содержащую рабочий буферный раствор для промывки, и дать постоять 60 с. Затем снова опорожнить лунки микропланшета (см. выше). Повторить процедуру промывания три раза. Удалить остатки жидкости и пузырьки из лунок, постучав перевернутым микропланшетом по нескольким слоям фильтровальной бумаги, уложенной на рабочий стол.

Предотвратить случайное выпадение стрипов из держателя, зафиксировав их клейкой лентой.

Автоматическое промывание микропланшета: По завершении периода инкубации удалить содержимое лунок микропланшета, используя автоматический промыватель, а затем заполнить каждую лунку рабочим буферным раствором для промывки. Повторить этапы опорожнения/заполнения лунок три раза. Затем опорожнить все лунки и постучать перевернутым микропланшетом по нескольким слоям фильтровальной бумаги, уложенной на рабочий стол, для удаления остатков жидкости и пузырьков.

Примечание 1 – Не дать лункам микропланшета полностью высохнуть, так как это может повлиять на результаты анализа.

Примечание 2 – Плохое промывание микропланшета может привести к ошибочным результатам. В любом случае, при использовании ручного или автоматического метода промывки следует убедиться в том, что каждая лунка микропланшета была заполнена одинаковым объемом буферного раствора для промывки одинаковое количество раз по сравнению с остальными лунками.

А.6.9.2.4 Внесение конъюгата антител

Используя автоматическую микропипетку, внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата антител (А.6.6.2) в каждую лунку микропланшета. Накрыть планшет для предотвращения контаминации и испарения.

Перед началом инкубации рекомендуется осторожно встряхнуть микропланшет. Для этого надо взяться за короткие стороны микропланшета указательным и большим пальцами и подвигать его из стороны в сторону.

Инкубировать микропланшет при 37 °С в течение 1 ч.

А.6.9.2.5 Промывание

По завершении периода инкубации повторить этап промывания (описан в А.6.9.2.3).

А.6.9.2.6 Внесение субстрата

Используя автоматическую микропипетку, внести по 100 мкл хромогенного субстрата (А.4.2.6) в каждую лунку микропланшета. Аккуратно встряхнуть микропланшет с целью перемешивания его содержимого и инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин.

Необходимо вносить хромогенный субстрат в лунки микропланшета без перерывов и соблюдать последовательность и временной интервал при пипетировании.

А.6.9.2.7 Добавление стоп-раствора

По завершении периода инкубации внести по 100 мкл стоп-раствора (А.4.2.7) в каждую лунку микропланшета. Добавить стоп-раствор в той же последовательности, что и при внесении хромогенного субстрата. Аккуратно встряхивать микропланшет в течение 10 с для остановки цветовой реакции и равномерно распределить стоп-раствор.

Необходимо вносить стоп-раствор в лунки микропланшета без перерывов и избегать воздействия солнечного света на микропланшет, в противном случае возможно изменение интенсивности окрашивания.

А.6.9.2.8 Регистрация поглощения

Воспользовавшись планшетным спектрофотометром, снабженным фильтром на 450 мкм, зарегистрировать поглощение в каждой лунке микропланшета, используемой в анализе. Регистрация поглощения должна быть произведена в течение 30 мин после добавления стоп-раствора.

Зарегистрировать полученные результаты и рассчитать средние значения поглощения в повторах или использовать соответствующую компьютерную программу.

А.7 Схемы

Таблица А.2 – Схема экстракции

Процедура	Описание
Навеска 0,5 г	Сделать навески анализируемых образцов, контрольного образца для метода, контрольных стандартных образцов
Добавление 4,5 мл	Добавить буферный раствор для экстракции (А.4.2.1)
Смешивание	Смешать анализируемую часть образца с буферным раствором для экстракции и встряхивать до образования гомогенной смеси; для соевой муки с нормальным содержанием жира – менее 5 мин, для обезжиренной соевой муки и изолята соевого белка – более 15 мин
Центрифугирование при 5 000 *g*	Центрифугировать образец при 5 000 *g* в течение 15 мин, желательно при 4 °С. Отобрать супернатант и перенести его в чистую пробирку
Разведение: 1 : 300 или 1 : 10 в зависимости от материала исследуемого образца	Развести полученные растворы анализируемого образца, отрицательного контрольного образца метода и контрольных стандартных образцов

Таблица А.3 – Схема проведения анализа методом ELISA

Процедура	Объем	Описание
Внесение	100 мкл	Внести разведенные растворы анализируемого образца, отрицательного контрольного образца метода и контрольных стандартных образцов в соответствующие лунки и перемешать
Инкубация		Инкубировать 1 ч при 37 °С
Промывание		Промыть 3 раза буферным раствором для промывки (А.6.7)
Внесение	100 мкл	Внести конъюгат антител (А.4.2.4) в каждую используемую лунку и перемешать
Инкубация		Инкубировать 1 ч при 37 °С

Окончание таблицы А.3

Процедура	Объем	Описание
Промывание		Промыть 3 раза буферным раствором для промывки (А.6.7)
Внесение	100 мкл	Внести конъюгат антител (А.4.2.4) в каждую используемую лунку и перемешать
Инкубация		Инкубировать 1 ч при 37 °С
Добавление	100 мкл	Добавить стоп-раствор (А. 4.2.7) в каждую используемую лунку и перемешать
Регистрация поглощения		Зарегистрировать поглощение при 450 нм в каждой лунке с помощью планшетного спектрофотометра

А.8 Анализ полученных данных

Данные должны быть зарегистрированы.

Для построения калибровочной кривой следует использовать значения поглощения контрольных стандартных образцов. Значение поглощения контрольного образца метода (пустой образец) следует вычесть из всех значений поглощений разведенных растворов анализируемых и контрольных образцов. Для построения калибровочной кривой следует использовать усредненные (по двум повторностям) исправленные значения поглощения каждого контрольного стандартного образца. Концентрацию анализируемого вещества в исследуемом образце интерполируют по полученной калибровочной кривой, используя усредненные значения поглощения соответствующих разведенных растворов анализируемых образцов.

А.9 Критерии приемлемости результатов анализа

Каждый проведенный анализ должен соответствовать критериям приемлемости результатов, перечисленным в таблице А.4. Анализ включает в себя следующее: отрицательный контрольный образец метода, положительные контрольные стандартные образцы, отрицательные контрольные стандартные образцы и образцы неизвестного содержания. Все растворы анализируемых и контрольных образцов используются в повторностях. Если анализ не соответствует критериям приемлемости результатов, его следует переделать. Растворы анализируемых образцов, не прошедшие по критериям приемлемости результатов, должны быть исследованы повторно.

Таблица А.4 – Критерии приемлемости результатов анализа

Отрицательный контрольный образец метода (буферный раствор)	A 450 нм < 0,30
Стандартный образец 0 % ГМО	A 450 нм < 0,30
Стандартный образец 2,5 % ГМО	A 450 нм ≥ 0,8
Все положительные контрольные стандартные образцы, OD	Коэффициент вариации OD повторностей ≤ 15 %
Анализируемые образцы, раствор	Коэффициент вариации OD повторностей ≤ 20 %

А.10 Статус

Это метод прошел проверку в межлабораторных сличительных испытаниях (МСИ) на сертифицированном стандартном образце CRM 410 в соответствии с требованиями ISO 5725. МСИ проводились Объединенным центром исследований Еврокомиссии (JRC EC), Испра, Италия, см. [3].

Протокол анализа, используемый в МСИ, отличался от описанного в настоящем стандарте по следующим параметрам:

– не использовалось просеивание через сито;

– не указывался срок годности реактивов;

– не приводилось описание процедуры пробоподготовки;

– метод применяли только при анализе стандартных образцов с концентрациями 0,1 %, 0,5 % и 2 % CRM 410;

– контрольные образцы стандартного состава анализировались без повторностей;

– количество образца было недостаточным для повторения анализа и определения соответствия критериям принятия/отклонения результатов.

Результаты межлабораторных сличительных испытаний приведены в таблице А.5.

Таблица А.5 – Данные прецизионности

Образец (в % ГМО в соевой муке)	0,5 %	1 %	2 %
Год проведения МСИ	1999	1999	1999
Количество участвующих лабораторий	37	37	37
Количество лабораторий, оставшихся после исключения участников, давших выпадающие значения результатов анализа	37	33	35
Количество лабораторий, давших выпадающие значения результатов анализа	0	4	2
Количество принятых результатов	37	33	35
Среднее значение $\bar{\chi}$, % ГМО	0,440	0,952	1,902
Процент от истинного значения	88,1	95,2	95,1
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,062	0,092	0,146
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, % [b]	12,4	9,2	7,3
Предел повторяемости $r [r = 2,8 \cdot s_r]$ [a]	0,176	0,260	0,414
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,083	0,123	0,186
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, % [b]	16,6	12,3	9,3
Предел воспроизводимости $R [R = 2,8 \cdot s_R]$ [a]	0,238	0,349	0,527

[a] s_r, s_R, r и R выражены в процентах ГМО.
[b] RSD_r и RSD_R выражены в процентах от истинного значения.

Библиография

[1] ISO 5725 (все части) — Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results
Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений

[2] ISO Guide 30:1992 — Terms and definition used in connection with reference materials
Термины и определения, используемые в области стандартных образцов

[3] Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling: In House method validation. In House validated methods and their role in methods of analysis for codex purposes. Codex Alimentarius Commission. (CX/MAS 98/8), 1998, Budapest, Hungary, 23 – 27 November 1998
(Комитет по нормированию аналитических методов и методов отбора проб. Внутрилабораторная валидация методов. Методы, прошедшие валидацию на внутрилабораторном уровне, и их место среди аналитических методов, применяемых для целей Кодекса. Комиссия Кодекс Алиментариус)

[4] Horwitz W.: Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. Pure and Applied Chemistry, 1995, 67: 331 – 343
(Протокол для подготовки, проведения и интерпретации результатов исследований эффективности метода. Чистая и прикладная химия)

[5] Lipp, M., Anklam, E., and Stave, J., 2000. Validation of an Immunoassay for Detection and Quantitation of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study. Journal of AOAC International. Vol. 83, No. 4, pp. 919 – 927
(Валидация иммунного анализа для обнаружения и количественного определения генетически модифицированных соевых бобов в пищевых продуктах и компонентах пищевых продуктов с использованием стандартных образцов. Межлабораторные исследования // Журнал Международной ассоциации официальной аналитической химии)

[6] GMO Food Ingredient Testing, Soya kit User's Guide, (1999) Strategic Diagnostics Inc., Rev. 052099, Vers. 1.8
(Испытания пищевых компонентов, содержащих ГМО. Руководство пользователя к набору для обнаружения генетически модифицированной сои)

УДК [664:604.6]:543.612.06(083.74)(476) МКС 67.050 IDT

Ключевые слова: количественный анализ, качественный анализ, предел обнаружения, предел измерения, стандартный образец, контрольный образец, тест-система, матрица, антиген, антитело, конъюгат, генетически модифицированный организм (ГМО), иммуноферментный анализ

gost.e-ecolog.ru