ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53244— 2008 (ИСО 21570:2005)

Продукты пищевые

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

Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот

ISO 21570:2005
Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods (MOD)

Издание официальное

БЗ 9—2008/285

Москва
Стандартинформ
2009

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Институтом физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук при участии Ассоциации «Биологическая, экологическая и продовольственная безопасность» на основе аутентичного перевода международного стандарта, указанного в пункте 4

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 декабря 2008 г. № 781-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 21570:2005 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот» (ISO 21570:2005 «Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quintitative nucleic acid basid methods»).

При этом в него не включены приложение С в части С3, С6 и С7 и приложение D в части D1 примененного международного стандарта, которые преждевременно применять в национальной стандартизации в связи с тем, что линии кукурузы Event176 и Bt11 не входят в перечень генно-инженерно-модифицированных организмов, разрешенных для реализации населению и использования в пищевой промышленности в Российской Федерации (2008 г.).

При этом дополнительные положения и требования, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены курсивом.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок, указанные в приложении Е

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2009

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Принцип 2
4.1 Общие положения 2
4.2 Амплификация, обнаружение и подтверждение продуктов ПЦР 2
4.3 Количественное определение продуктов ПЦР 2
5 Реактивы 2
6 Приборы и оборудование 3
7 Руководство, касающееся процедуры 3
7.1 Общие положения 3
7.2 Стабильность целевой последовательности 3
7.3 Калибровка анализа 3
7.4 Особенности количественного определения 3
7.5 Требования к обеспечению качества 3
8 Интерпретация результатов 4
9 Выражение результата 4
10 Протокол испытания 5
Приложение А (рекомендуемое) Метод, специфический для целевого таксона 6
Приложение В (рекомендуемое) Методы скрининга 11
Приложение С (рекомендуемое) Методы, специфические для конструкций 17
Приложение D (рекомендуемое) Метод, специфический для трансформационного события 52
Приложение Е (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок 57
Библиография 58

Введение

Поиск ингредиентов полученных генетически модифицированных организмов осуществляется путем следующих последовательных (или одновременных) стадий. После отбора *анализируемой пробы* из *лабораторной пробы* экстрагируются нуклеиновые кислоты. Экстрагированные нуклеиновые кислоты могут далее очищаться в процессе экстракции или после него. Затем производят его количественное определение (при необходимости), разбавление (при необходимости), и он подвергается аналитическим процедурам (таким как ПЦР). Эти стадии подробно изложены в настоящем Международном стандарте и в следующих Международных стандартах:

ИСО 21569 Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на качественном определении нуклеиновых кислот [*1*];

ИСО 21571 Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот [*2*].

Международная организация по стандартизации (ИСО) обращает внимание на тот факт, что заявлено, что соблюдение настоящего документа может включать использование патента, касающегося технологии ПЦР.

ИСО было проинформировано, что Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. и Hoffman-La Roche являются держателями патентных прав, касающихся технологии ПЦР. Компании гарантировали ИСО, что они намерены вести переговоры о лицензиях на приемлемых и не дискриминационных условиях с заявителями по всему миру. В этой связи заявления держателей этих патентных прав зарегистрированы ИСО. Информация может быть получена от:

Licensing Department
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404, USA
и
Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501, USA.

Обращается внимание на возможность того, что некоторые элементы настоящего документа могут быть предметом патентных прав иных, чем определенные выше. ИСО не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Продукты пищевые

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

Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот

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

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, а также корма и растительные образцы, отобранные из окружающей среды.

Настоящий стандарт устанавливает количественные методы определения генетически модифицированных организмов (далее — ГМО) в пищевых продуктах, а также в кормах и растительных образцах, отобранных из окружающей среды с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), и общие требования к специфической амплификации целевых последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с целью количественного определения содержания ДНК из ГМО, а также для подтверждения идентичности амплифицированной последовательности ДНК.

Основные принципы, минимальные требования и критерии исполнения, изложенные в настоящем стандарте, предназначены для обеспечения сравнимости, точности и воспроизводимости результатов, получаемых в разных лабораториях.

Методы количественного определения содержания ДНК из ГМО и подтверждения идентичности амплифицированной последовательности ДНК приведены в приложениях A—D.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 50779.11—2000 (ИСО 3534-2—93) Статистические методы. Статистическое управление качеством. Термины и определения

ГОСТ Р 52173—2003 Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения

ГОСТ Р 52174—2003 Биологическая безопасность. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения с применением биологического микрочипа

ГОСТ Р 53214—2008 (ИСО 24276:2006) Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения

Издание официальное

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 50779.11 и ГОСТ Р 53214.

4 Принцип

4.1 Общие положения

Каждый количественный метод, приведенный в приложениях A—D*, определяет конкретную целевую последовательность(и) ДНК*.*

Результат количественного определения должен явно выражать *(в процентах)* содержание целевой последовательности относительно количества специфического стандарта, соответствующих калибровок и контролей и быть внутри динамического диапазона применяемого аналитического метода и *анализируемой пробы.*

Количественное определение** состоит:

- из амплификации одной или большего числа специфических целевых последовательностей;
- обнаружения и подтверждения специфичности продукта(ов) ПЦР и
- определения содержания амплифицированных фрагментов (продуктов ПЦР) относительно калибровок.

Отбор проб — по *ГОСТ Р 52173, ГОСТ Р 52174.*

4.2 Амплификация, обнаружение и подтверждение продуктов ПЦР

Принципы амплификации, обнаружения и подтверждения последовательностей ДНК — в соответствии с ИСО 21569 [*1*].

4.3 Количественное определение продуктов ПЦР

Принцип количественного определения состоит в определении соотношения (выраженного в процентах) двух целевых последовательностей ДНК, т. е. последовательности, представляющей интересующий генетически модифицированный организм и последовательности (эндогенной), специфической для целевого таксона.

Материалы, применяющиеся для калибровки, которые используют для количественного определения, должны быть пригодными для контроля с сертифицированными эталонными материалами (СЭМ), если таковые имеются. Если такие материалы отсутствуют, *следует использовать* другие подходящие эталонные материалы***.

5 Реактивы

Все реактивы и материалы, используемые для анализа, должны быть идентичны или эквивалентны определенным в методе. В противном случае все реактивы и материалы должны иметь квалификацию «для молекулярно-биологических работ» (molecular biology grade). Эти реактивы следует хранить и использовать, как рекомендовано производителем или в соответствии с техническими требованиями обеспечения качества лабораторных работ *в соответствии с ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025.*

---

* *Количественное определение допускается проводить с использованием конкурентной ПЦР* [*3*],[*4*] *или ПЦР в реальном времени* [*5*],[*6*].

** *В случае использования ПЦР в реальном времени амплификация, обнаружение и подтверждение происходят одновременно.*

*** *Примерное руководство приведено в* [*7*]. Информация об исследованиях подтверждения достоверности и погрешности измерений собраны в международных исследованиях [*8*], [*9*], [*10*], [*11*].

6 Приборы и оборудование

См. приложения A—D и *ГОСТ Р 53214.*

7 Руководство, касающееся процедуры

7.1 Общие положения

Общие требования, имеющие отношение к ПЦР-амплификации для обнаружения ГМО, описаны в ИСО 21569 [*1*].

В приложениях A—D описаны методы ПЦР-детектирования наряду с деталями их возможностей и применения. Для каждого метода подробно описаны демонстрируемые рабочие характеристики.

Концентрация анализируемой последовательности ДНК должна находиться внутри динамического диапазона метода.

Примечание — Для определения достаточно ли качество кодирующей нити ДНК (по длине и структурной целостности), а также достаточны ли ее чистота и количество для обеспечения обнаружения и количественного определения ГМО, принадлежащего к целевому таксону, может быть проведен контроль, специфический для целевого таксона. Он может быть тем более обоснован, когда ДНК экстрагирована из композитного или подвергнувшегося глубокой обработке материала.

ДНК, экстрагированная из каждой *анализируемой пробы,* должна быть проанализирована не менее чем в двух повторностях.

Должны быть использованы соответствующие контроли [*см. ГОСТ Р 53214 (таблица 1)*].

7.2 Стабильность целевой последовательности

Для сортов различного географического и филогенетического происхождения *следует учитывать* стабильность целевой последовательности как аллельную, так и по числу копий.

7.3 Калибровка анализа

Следует применять соответствующее число калибровочных точек и повторностей, охватывающих диапазон количественного определения [например, четыре калибровочных точки в двух повторностях (всего *четыре* × *два* значения) или шесть калибровочных точек с одним измерением в каждой точке (всего *шесть* значений)]. Качество калибровки влияет на погрешность измерения [*11*].

В качестве альтернативы геномной ДНК в качестве эталонного материала для калибровки *допускается* использовать, например, серию разбавлений плазмиды или синтетической двухцепочечной ДНК, содержащих целевую последовательность, при условии, что она демонстрирует при калибровке поведение, аналогичное эталонному материалу геномной ДНК и геномной ДНК, экстрагированной из *анализируемой пробы.*

7.4 Особенности количественного определения

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

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

Предел количественного определения (LOQ) — *в соответствии с ГОСТ Р 53214.*

На расчет содержания ГМО, основанный на числе копий целевых последовательностей в гаплоидном геноме, влияет гомо- и гетерозиготность изучаемых *проб* (см. приложения A—D).

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

7.5 Требования к обеспечению качества

Для установления достоверности изменений необходимо знание относительного стандартного отклонения воспроизводимости метода в соответствии с *ГОСТ Р 5725-1 и ГОСТ Р 5725-6.* Если наличие происходящей из ГМО ДНК (в процентах) запротоколировано, необходимы:

а) согласованность результатов для каждой лабораторной пробы, достигающаяся:

- через отбраковку измерений меньших, чем предел количественного определения, и

- через максимальное отклонение, наблюдаемое между разбавлениями и индивидуальными измерениями, равное *значению*, ожидаемому, исходя из соответствующего фактора разбавления, ± 33 %;

b) согласованность между тестируемыми частями лабораторной пробы:

- определенные относительные концентрации происходящей из ГМО ДНК, полученные с учетом перечисленного в пункте а), для каждой *анализируемой пробы* не должны различаться на *значение* более чем от минус 50 % до плюс 100 % *значения* обнаруженного количества (равного ΔC_t 1 при ПЦР в реальном времени) (т. е. для двух *анализируемых проб* приемлемы результаты измерений 1,0 % и 2,0 %, в то время как 0,9 % и 2,1 % — неприемлемы).

Для того чтобы гарантировать точность измерений для количества происходящей из ГМО ДНК следует выбирать и анализировать стандартный материал (СМ), предпочтительно сертифицированный (ССМ), с соответствующим уровнем метрологической надежности и с надлежащим сходством вещества продукта. В отсутствие ССМ может быть приготовлен СМ собственного производства с помощью процедуры, обеспечивающей стабильность, однородность и единство измерений и гарантирующей отсутствие систематической погрешности. Оцененная количественно погрешность должна удовлетворять требуемой для калибровки (см. ИСО Руководство 32) [*12*].

8 Интерпретация результатов

Результаты ПЦР могут быть либо

а) пригодными для количественной оценки целевой последовательности при условии, что

- результат положительный в соответствии с ИСО 21569 (подраздел 8.1) [*1*] *и таблицей 2 ГОСТ Р 53214;*
- наблюдаемое ингибирование реакции незначительно;
- аналитические процедуры дают недвусмысленные значения измерений;
- количество целевой последовательности находится внутри динамического диапазона метода и
- проведена калибровка аналитической процедуры в соответствии с 7.3,

либо

b) не пригодными для количественной оценки целевой последовательности, если любое из перечисленных выше условий не было соблюдено.

Для того чтобы лаборатория могла дать обоснованное заключение, погрешность измерения должна быть достаточно мала.

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

Если количество целевой ГМ-последовательности или последовательности, специфической для целевого таксона, *установленное в ходе испытания*, ниже предела количественного определения *(*LOQ*)*, результат *следует* выражать только качественно *(в анализируемой пробе ДНК из ГМО присутствует)*.

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

9 Выражение результата

Результаты должны ясно констатировать количество целевой ГМ-последовательности относительно последовательности, специфической для целевого таксона. Результаты должны также содержать *значения* погрешности измерения, такие как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение. Кроме того, следует приводить значения предела детектирования и предела количественного определения метода и фактические пределы детектирования и количественного определения.

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

Таблица 1 — Выражение результатов

Результат	Выражение результата
Последовательность, специфическая для целевого таксона, не обнаружена	См. ИСО 21569 [*1*]. «Для вида *x** » ДНК не обнаружена»
Последовательность, специфическая для целевого таксона, обнаружена, но не обнаружена целевая последовательность, происходящая из ГМО	В соответствии с ИСО 21569 [*1*]. «Для вида *x*» ДНК, происходящая из ГМО, не обнаружена». В надлежащих случаях, кроме того, добавляется «Фактический предел детектирования составляет *X* %» (указывают используемые единицы измерения)
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая последовательность, происходящая из ГМО, однако, количество, по крайней мере, одной из целевых последовательностей ниже предела количественного определения	Для каждого ГМО констатируется: «ДНК, происходящая из ГМО (специфицируется ГМО), обнаружена с помощью (специфицируется целевая последовательность), полученной из (специфицируется вид)». В надлежащих случаях, кроме того, добавляется «Фактический предел количественного определения составляет *X* %» (указывают используемые единицы измерения)
Обнаружены как последовательность, специфическая для целевого таксона, так и целевая последовательность, происходящая из ГМО, и количество обеих целевых последовательностей выше предела количественного определения	Для каждого ГМО констатируется: «Содержание ДНК, происходящей из ГМО (специфицируется ГМО), обнаруженное с помощью (специфицируется целевая последовательность) полученной из (специфицируется вид), составляет *X* ± погрешность, %» (указывают используемые единицы измерения)
** Указывают таксономическую принадлежность анализируемого растения. Например, «ДНК сои не обнаружена».*	

Допускается также указывать содержание ДНК, происходящей из ГМО, с учетом погрешности измерения как в том случае, когда оно превышает конкретное значение, так и когда не достигает *его*.

10 Протокол испытания

Протокол испытания — в соответствии с *ГОСТ Р 53214* и ИСО 21569 [*1*] и должен содержать следующую дополнительную информацию:

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

b) фактический предел количественного определения;

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

d) ссылку на использованные материалы;

e) результаты, выраженные в соответствии с разделом 9.

Приложение А
(рекомендуемое)

Метод, специфический для целевого таксона

А.1 Метод определения абсолютного количественного содержания ДНК гена *adh1* из кукурузы (специфический для целевого таксона) с использованием метода ПЦР в реальном времени

А.1.1 Введение

В этом приложении описан метод специфической амплификации и количественного определения (вспомогательного) гена *adh1* (кодирующего алкогольдегидрогеназу 1) из кукурузы (*Zea mays*) для определения содержания ДНК кукурузы или для обнаружения присутствия/отсутствия в растворах ДНК, экстрагированной из продуктов, содержащих кукурузную ДНК, например, из пищевых продуктов, детектируемых количеств ингибиторов ПЦР.

Ограничения см. в А.1.8.

А.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

А.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для ДНК, экстрагированной из чистых размолотых кукурузных зерен, листьев кукурузы и сертифицированных стандартных материалов (серий IRMM-411, IRMM-412, IRMM-413 [*13*], [*14*]).

Воспроизводимость описанного метода была проверена с помощью совместных испытаний лабораторий с использованием неизвестных образцов (от U1 до U6), состоящих из ДНК кукурузы дикого типа с различным числом копий соответствующей целевой последовательности (см. А.1.2.2), а также в других совместных испытаниях лабораторий в комбинации с методами, специфическими для трансформационных событий ГМ-кукурузы.

Число копий целевой последовательности на гаплоидный геном должно быть равно *единице* [*14*].

Должна быть установлена аллельная стабильность целевой последовательности [*14*].

А.1.2.2 Совместные испытания лабораторий*

Для построения калибровочной кривой для определения абсолютного количества гаплоидных геномов кукурузы в неизвестных образцах были использованы шесть образцов (S1—S6) ДНК кукурузы дикого типа (экстрагированной из материала листьев [*16*], содержащей известное абсолютное число копий (183486, 61162, 20387, 6796, 2265 и 755) гаплоидных геномов кукурузы. Абсолютное число копий в известных образцах было определено путем деления массы ДНК (определенной методом флуориметрического количественного определения двухцепочечной ДНК производства фирмы PicoGreen, Molecular Probes, Cat. Number P-7589) на опубликованное среднее значение 1С для геномов кукурузы (2,725 пг) [*17*].

Шесть образцов (U1—U6) ДНК кукурузы дикого типа (экстрагированной из материала листьев [*16*]) были использованы в качестве неизвестных образцов. Ожидаемое число копий в неизвестных образцах было определено тем же методом, что и в известных образцах.

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

Валидация метода была также проведена в комбинации с методами, специфическими для трансформационных событий для нескольких образцов ГМ-кукурузы, например, для сладкой кукурузы Bt11. Подробности комбинированных испытаний (относительного количественного определения) см. в [*18*] и [*19*].

Таблица А.1 — Данные валидации

Наименование показателя	Образец					
	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Число участвовавших лабораторий	12	12	12	12	12	12
Число лабораторий, имевших возвратные результаты	10	10	10	10	10	10
Число неработоспособных (invalid) лабораторий	1	1	1	1	1	1

* Подтверждение достоверности (валидация) метода было проведено в ходе совместных испытаний лабораторий, организованных Объединенным исследовательским центром Еврокомиссии (EC-JRC) и Институтом защиты здоровья и потребителей (IHCP) в соответствии с Международным протоколом гармонизации [*15*].

Окончание таблицы А.1

Наименование показателя	Образец					
	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Число поддержанных лабораторий	9	9	9	9	9	9
Число образцов на лабораторию	4	4	4	4	4	4
Число выбросов по Кохрану	1	1	1	1	—	—
Число выбросов по Граббсу	—	1	1	1	1	1
Число принятых образцов	35	34	34	34	35	35
Ожидаемое число копий	7339	18349	36697	55046	91743	146788
Среднее число копий	9985	23885	46918	75161	100541	122080
Отклонение от истинного *значения*, %	36,1	30,2	27,9	36,5	9,6	–16,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	1318,59	1463,60	5796,58	4539,57	11306,89	14843,41
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	13,21	6,13	12,35	6,04	11,25	12,16
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	2013,12	2083,57	6145,39	6806,85	14592,04	17777,70
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	20,16	8,72	13,10	9,06	14,51	14,56

[a] Выражается как число копий.
[b] Выражается как процент от среднего *значения*.

А.1.2.3 Молекулярная специфичность

А.1.2.3.1 Общие положения

Метод был разработан для использования в качестве целевой части последовательности, описанной в EMBL/GenBank/DDBJ, регистрационный номер X04050. Эта последовательность является уникальной для *Zea mays* (кукуруза/маис) и *Zea mays subsp. diploperennis* (теосинте мексиканского) [*14*].

А.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов была оценена путем поиска в базах данных EMBL/GenBank/DDBJ с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN на сайте *Национального института здравоохранения США* [9 октября 2003 г.]. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемыми целевыми последовательностями.

А.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Специфичность метода была проверена в отношении широкого диапазона нецелевых таксонов и 20 различных линий кукурузы, представляющих географическое и филогенетическое разнообразие образцов [*14*]. Не было обнаружено перекрестной реактивности с нецелевыми таксонами (за исключением теосинте мексиканского *Zea mays subsp. diploperennis*, дикого предка культурной кукурузы) [*14*], [*20*]. Были установлены число копий и аллельная стабильность целевой последовательности у различных линий кукурузы [*14*].

А.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для системы детектирования последовательностей (СДП) ABI PRISM 7700® и набора TaqMan® химия. Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

А.1.2.5 Предел детектирования (LOD)

В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOD составляет 10 копий целевой последовательности [*14*]. Наименьшее число копий целевой последовательности, включенных в совместные испытания лабораторий, составляло 7399 копий целевой последовательности.

А.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOQ составляет 100 копий целевой последовательности [*14*]. Наименьшее число копий целевой последовательности, включенных в совместные испытания лабораторий, составляло 7399 копий целевой последовательности.

А.1.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

А.1.4 Принцип

Фрагмент гена *adh*1 в 134 п. о. амплифицировали с использованием двух кукурузных *adh*1-специфических праймеров (см. таблицу А.2). Накопление продуктов ПЦР измеряли в конце каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью кукурузного *adh*1-специфического олигонуклеотидного зонда (ADH1-MDO, см. таблицу А.2), меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся *набор* TaqMan® химия.

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

А.1.5 Реактивы

А.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, *см. ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6).*

А.1.5.2 Вода.

А.1.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10×.

А.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, $c(MgCl_2)$ = 25 ммоль/*дм*^{3}.

А.1.5.5 Раствор дНТФ, c(дНТФ) = 2,5 ммоль/*дм*^{3} (каждый).

А.1.5.6 Олигонуклеотиды

Характеристики применяемых олигонуклеотидов приведены в таблице А.2.

Таблица А.2 — Олигонуклеотиды

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

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

А.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold®.

А.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (необязательно)

А.1.5.9 Реакционная смесь для амплификации

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

Таблица А.3 — Реакционная смесь для амплификации, окончательные объем/концентрация на одну реакционную пробирку

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

А.1.6 Прибор

А.1.6.1 Общие положения

Следует использовать стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

А.1.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль изначально был оттестирован *при помощи* прибора СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации реакционных условий.

А.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере реального времени, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate, или MicroAmp® Optical Caps (*восемь* крышек на полоску, плоская) (Applied Biosystems).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

А.1.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

А.1.7.1 Общие положения

Порядок проведения ПЦР для целевой последовательности референсного гена и для целевой последовательности ГМО следует проводить в отдельных пробирках, если иное не указано в соответствующем приложении для ГМ-специфических целевых последовательностей.

Метод изложен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 25 мкл с реактивами, список которых приведен в таблице А.3.

А.1.7.2 Контроли ПЦР

Если контроли не дают ожидаемого результата, результаты анализа должны быть аннулированы, а сам анализ должен быть повторен.

В качестве положительного контроля и/или стандартного материала для калибровки может быть использована высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из кукурузы (например, CCM от JRC, IRMM [*16*]. Должны быть проведены все соответствующие контроли, как это описано в *ГОСТ Р 53214.*

А.1.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице А.4, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В исследовании по подтверждению достоверности метода ABI PRISM® *7700* использовался совместно с AmpliTaq Gold® ДНК-полимеразой. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Температура и время, необходимые для активации фермента, зависят от особенностей используемой полимеразы. Условия реакции приведены в таблице А.4.

Таблица А.4 — Процедура: условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (50 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	60

А.1.8 Ограничения и интерпретация результатов

Присутствие ингибиторов ПЦР может оказать сильное влияние на точность оценки числа копий *adh*1-последовательности в анализируемых образцах. Поэтому необходимо проверять присутствие или отсутствие детектируемого количества ингибиторов ПЦР (см. также ИСО 21571, приложение А, [*2*]), например, путем проведения серии разбавлений кодирующей нити ДНК и проверки соответствия между разбавлениями и различиями значений C_t (порогового цикла), т. е. одной единице C_t соответствует удвоение концентрации кодирующей нити ДНК.

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

А.1.9 Калибровка и результаты расчетов

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

Калибровочную кривую получают путем построения графика зависимости *значения C_t относительно логарифма* числа копий целевой последовательности для калибровочной точки. Это может быть осуществлено, например, путем использования программного обеспечения (электронной таблицы), такого как Microsoft Excel, или напрямую с помощью опций, доступных в программном обеспечении системы детектирования последовательностей.

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

Приложение В
(рекомендуемое)

Методы скрининга

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

В.1.1 Введение

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

Ограничения см. в В.1.8.

В.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

В.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для сертифицированных стандартных материалов (CCM IRMM-410) [*21*], состоящих из высушенной муки соевых бобов, включающих смеси сои GTS 40-3-2 и обычной сои.

Воспроизводимость приведенных методов была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием неизвестных образцов (образцы, помеченные как SA—SE, см. таблицу В.1), состоявших из смеси стандартных материалов, тип которых упомянут выше [*22*]. Кроме того, были протестированы коммерчески доступные пищевые продукты [*23*].

Число копий каждой из целевых последовательностей на геном подробно оценено не было [*24*], [*25*].

Метод был опубликован в [*26*].

В.1.2.2 Совместные испытания лабораторий

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

Метод, специфичный для детектирования 35S-промотора, дал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 17 % до 34 % (см. таблицу В.1). В ходе начальных экспериментов совместных испытаний лабораторий было определено, что 1 %-ный соевый ССМ не соответствовал заявленному значению. Исследования показали, что различавшиеся стандартные материалы были изготовлены разными способами в разное время, что и привело к разному уровню деградации ДНК. Участники совместного испытания лабораторий были поставлены в известность о необходимости в ходе этого совместного испытания применять 2 %-ный ССМ и разбавлять его для получения раствора 1 %-ной стандартной ДНК для использования при количественном определении.

Для экстракции ДНК использовалась процедура, описанная в [*26*]. 200 мг материала образца было лизировано в 1 см^3 буфера гуанидингидрохлорид/протеиназа К (0,5 ммоль/дм^3; 0,8 мг/см^3) при *температуре* 56 °С в течение 3 ч. После стадии обработки РНазой 500 мкл очищенного экстракта смешивалось с 1 см^3 силиконовой смолы Wizard®, и смола со связанной ДНК возвращалась путем отсасывания через колонку с фильтром Wizard®. После промывания изопропанолом ДНК элюировали с силиконовой смолы 10 ммоль/дм^3; Трис-буфером pH 9,0 при *температуре* 70 °С. Концентрацию ДНК оценивали с помощью измерения оптической плотности при 260 нм и приводили к уровню 20 мкг/см^3. Для последующего ПЦР-анализа 200 нг ДНК из каждого образца были проанализированы в двух независимых реакциях.

Образцы анализировались в двух повторностях.

Так как образцы, помеченные SA—SE, представляли собой смеси этих различных стандартов, результаты, полученные с помощью этих образцов, не могут быть использованы для оценки истинности предложенного метода ПЦР в реальном времени. Однако эти результаты могут быть использованы для оценки точности этого метода, в силу чего описанные обстоятельства отражают наихудший вариант, ведущий к недооценке точности прикладного метода ПЦР в реальном времени [*22*].

Исключение лабораторий основано на использовании приборов ПЦР в реальном времени и на статистическом расчете «выбросов». Метод был разработан для блочных термоциклеров. Поэтому две лаборатории, использовавшие системы LightCycler®, были исключены еще до расчета «выбросов». Причина исключения определенных приборов для ПЦР состояла в наблюдении, что прикладной метод нуждается в тщательной адаптации и оптимизации в том случае, если он проводится на приборе для ПЦР в реальном времени, отличном от того, который изложен в методе. Оставшиеся лаборатории были, кроме того, проверены на выбросы по Граббсу [*27*]. Однако не было обнаружено ни одного выброса. Подробности совместного испытания лабораторий приведены в таблице В.1.

Таблица В.1 — Данные валидации 35S-промотор-специфического обнаружения ГМО в 1999 г.

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

Кроме того, четырьмя участниками межлабораторных испытаний были проанализированы четыре неизвестных коммерчески доступных образца пищевой продукции, содержавшей от 0,3 % до 36 % (по массе; средние значения) генетически модифицированной сои линии GTS 40-3-2. Метод, специфический для детектирования 35S-промотора, показал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 17 % до 28 % [*23*].

В.1.2.3 Молекулярная специфичность

В.1.2.3.1 Общие положения

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

Список генетически модифицированных растений, содержащих CaMV 35S-промотор, приведен в [*28*].

Может быть получен ложноположительный результат вследствие того, что амплифицированная последовательность происходит из цветной капусты и других представителей семейства *Brassicaceae (Cruciferae)*, а также *Resedaceae* и *Solanaceae*, инфицированных вирусом мозаики цветной капусты [*29*], [*30*]. Поэтому положительные результаты, касающиеся *Brassicaceae, Resedaceae* и *Solanaceae*, должны тщательно рассматриваться. Положительные результаты могут указывать на присутствие продуктов, происходящих из ГМ-растений, но не должны интерпретироваться как доказательство присутствия продуктов, происходящих из ГМ-растений, без дополнительного подтверждения.

Для того, чтобы отличить вирусную инфекцию от ГМ-материала, *допускается* использовать методы обнаружения вируса мозаики цветной капусты [*31*].

В.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

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

В.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Экспериментальная специфичность метода была оценена путем анализа ССМ IRMM-410 из высушенной соевой муки производства IRMM, содержащей от 0 % до 5 % сои линии GTS 40-3-2 и стандартного материала фирмы Leatherhead Food Research Association International — соевой муки с полным содержанием масла (Lot No. 2/99-01), содержащей 0 %, 0,3 %, 1,25 % и 2 % сои линии GTS 40-3-2, соответственно.

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

В.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для системы детектирования последовательностей (СДП) ABI PRISM 7700® и набора TaqMan® химия.

Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

В.1.2.5 Предел детектирования (LOD)

Поскольку метод является количественным, LOD прямо не оценивался. LOD должен быть лучше или равным пределу количественного определения, т. е. 50 геномных копий сои линии GTS 40-3-2 в 82000 геномных копиях обычной соевой муки.

В.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

LOQ был определен путем измерения серии разбавлений целевой ДНК, как описано в [*23*]. В соответствии с рекомендациями разработчика метода LOQ составляет 50 геномных копий сои линии GTS 40-3-2 в 82000 геномных копиях обычной соевой муки. Величину 1С см. в [*23*]. В соответствии с этими данными оцененный относительный LOQ составляет 0,06 (= 50 копий/82000 копий × 100 %).

Концентрации, исследованные в совместном испытании лабораторий, приведены в таблице В.1.

Примечание — Число копий в совместном испытании лабораторий не определялось.

В.1.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

В.1.4 Принцип

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

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

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

В.1.5 Реактивы

В.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве *используемых* реактивов см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6).*

В.1.5.2 Вода.

В.1.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10×.

В.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, $c(MgCl_2)$ = 25 ммоль/дм^3.

В.1.5.5 Раствор дНТФ, c(дНТФ) = 2,5 ммоль/дм^3 (каждый).

В.1.5.6 Олигонуклеотиды

Характеристики применяемых олигонуклеотидов приведены в таблице В.2.

Таблица В.2 — Олигонуклеотиды

Наименование олигонуклеотида	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность референсного гена		
Лектин-F	5′-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3′	900 нмоль/дм^3
Лектин -R	5′-ggC ATA gAA ggT gAA gTT gAA ggA-3′	900 нмоль/ дм^3
Лектин -TMP	5′-FAM-AAC Cgg TAg CgT TgC CAg CTT Cg-TAMRA-3′[a]	100 нмоль/дм^3
Целевая последовательность ГМО		
35S-F	5′-gCC TCT gCC gAC AgT ggT-3′	300 нмоль/дм^3
35S-R	5′-AAg ACg Tgg TTg gAA CgT CTT C-3′	900 нмоль/дм^3
35S-TMP	5′-FAM-CAA AgA Tgg ACC CCC ACC CAC g-TAMRA-3′[a]	100 нмоль/дм^3
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Длина лектинового ПЦР-продукта составляет 81 п. о.; длина 35S ПЦР-продукта составляет 82 п. о.

В.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold®.

В.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (необязательно).

В.1.6 Прибор

В.1.6.1 Общие положения

Следует использовать стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

В.1.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль изначально был оттестирован с приборами СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) и СДП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems). *Допускается* использовать другие системы СДП ПЦР в реальном времени после адаптации реакционных условий.

В.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (восемь крышек на полоску, плоская) (Applied Biosystems).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

В.1.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

В.1.7.1 Общие положения

Порядок проведения ПЦР для целевой последовательности референсного гена и целевой последовательности ГМО следует проводить в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод изложен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 50 мкл с реактивами, приведенными в таблице В.3.

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

Целевая последовательность референсного гена		
Суммарный объем		50 мкл
Кодирующая нить ДНК (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[a]	1×
$MgCl_2$		5 ммоль/дм^3
Праймеры	Лектин-F и Лектин-R (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонд	Лектин-TMP (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
Целевая последовательность ГМО		
Суммарный объем		50 мкл
Кодирующая нить ДНК (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[a]	1×
$MgCl_2$		5 ммоль/дм^3
Праймеры	35S-F и 35S-R (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонд	35S-TMP (см. таблицу В.2)	См. таблицу В.2

[a] ROX — карбокси-Х-родамин.

В.1.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительного контроля и стандартного материала для калибровки могут быть использованы сертифицированные стандартные материалы GTS 40-3-2 (материалы, содержащие от 0,1 % до 5 % генетически модифицированной сои), производимые IRMM, Geel, Бельгия (серии IRMM-410) [*21*].

Следует провести все соответствующие контроли, как это описано в *ГОСТ Р 53214.*

В.1.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице В.4, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В исследовании по подтверждению достоверности метода ABI PRISM® 7700 использовался совместно с AmpliTaq Gold® ДНК-полимеразой. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Температура и время, необходимые для активации/инициации денатурации, зависят от особенностей используемой полимеразы.

Условия реакции приведены в таблице В.4.

Таблица В.4 — Процедура: условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	60

В.1.8 Ограничения и интерпретация результатов

Так как некоторые ГМО, а не только соя линии GTS 40-3-2, могут содержать последовательность ДНК 35S-промотора, метод пригоден только для количественного определения ДНК сои линии GTS 40-3-2 в отсутствии ГМО, иных, чем соя GTS 40-3-2. Во всех других случаях метод может быть применен только для скрининга и целей контроля.

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

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

В.1.9 Калибровка и расчет результатов

После определения порогового *значения* [например, от 0,01 до 0,1 нормализованной флуоресценции репортерного красителя (R_n)] система детектирования последовательностей рассчитывает значения C_t (*число* пороговых циклов) для каждой ПЦР (метод $\Delta\Delta C_t$). Рассчитывают различия между значениями C_t 35S-специфического и лектин-специфического образцов ($\Delta C_{t,\,обр}$) и стандартных образцов ($\Delta C_{t,\,ст}$). Относительное количество 35S-ДНК в образце (*w*), *%,* относительно стандартного материала рассчитывают по *формуле*

$$w = 2^{-(\Delta C_{t,\,обр} - \Delta C_{t,\,ст})} \cdot c_{ст}, \qquad (В.1)$$

где $c_{ст}$ — концентрация стандартного образца.

Альтернативным образом калибровочная кривая рассчитывалась (log [*c*] относительно C_t) системой детектирования последовательностей на основе стандартов, состоящих из смесей ГМО известных концентраций генетически модифицированной сои линии GTS 40-3-2 (например, 0,1 %; 0,5 %, 1 %; 2 % и 5 %) или стандартов, состоящих из подходящих разбавлений стандартных растворов, полученных из смесей ГМО с определенной концентрацией сои линии GTS 40-3-2 (например, 5 %) — метод двойной калибровочной кривой. Эта калибровочная кривая применяется для определения концентрации сои линии GTS 40-3-2 в неизвестном образце. Поскольку ДНК образца может быть деградирована вследствие процесса приготовления пищевого продукта или из-за того, что образец может содержать ингредиенты иные, чем соевые бобы, рассчитанная концентрация GTS 40-3-2 должна быть нормализована в соответствии с количеством амплифицируемой соевой ДНК, присутствующей в образце. Это количество определяют с помощью ПЦР в реальном времени, специфической для гена соевого лектина, с использованием в качестве стандартной ДНК смесей ДНК определенной концентрации (например, 100 %, 50 %, 25 %, 10 % и 1 % по

массе) соевой ДНК из серии IRMM 410, разбавленных подходящим ДНК-носителем. Для нормализации измеренное количество ДНК сои линии GTS 40-3-2 делится на измеренное количество соевой ДНК.

Для этой альтернативной процедуры при расчете результатов важно, чтобы абсолютное количество кодирующей нити ДНК (нг) было одинаковым для каждой ПЦР, использованной для калибровки.

Другая альтернативная процедура описана в С.2.

Приложение С
(рекомендуемое)

Методы, специфические для конструкций

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

С.1.1 Введение

В этом приложении приведен метод специфической амплификации и обнаружения таксон-специфического гена сои (ген лектина, *le*1) и ДНК, происходящей из специфической генной конструкции, присутствующей в генетически модифицированной сое линии GTS 40-3-2. Этот метод пригоден для количественного определения количества ДНК, происходящей из генетически модифицированной сои линии GTS 40-3-2, в соевых ингредиентах, содержащих генетически модифицированную сою линии GTS 40-3-2 (Roundup Ready®).

Ограничения см. в С.1.7.

С.1.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.1.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для сертифицированных стандартных материалов (CCM IRMM-410) [*21*], состоящих из высушенной муки соевых бобов, включающих смеси сои GTS 40-3-2 и обычной сои.

Воспроизводимость приведенных методов была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием неизвестных образцов (образцы, помеченные как SA—SE, см. таблицу С.1), состоявших из смеси стандартных материалов, тип которых упомянут выше [*22*]. Кроме того, были протестированы коммерчески доступные пищевые продукты [*23*].

Число копий каждой из целевых последовательностей на геном подробно оценено не было [*24*], [*25*].

Метод был опубликован в [*26*].

С.1.2.2 Совместные испытания лабораторий

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

Метод, специфичный для детектирования конструкции GTS 40-3-2, дал относительное стандартное отклонение воспроизводимости в диапазоне от 16 % до 28 % (см. таблицу С.1). В ходе начальных экспериментов совместных испытаний лабораторий было определено, что 1 %-ный соевый ССМ не соответствовал заявленному *значению*. Исследования показали, что различавшиеся стандартные материалы были изготовлены разными способами в разное время, что и привело к разному уровню деградации ДНК. Участники совместного испытания лабораторий были поставлены в известность о необходимости в ходе этого совместного испытания применять 2 %-ный ССМ и разбавлять его для получения раствора 1 %-ной стандартной ДНК для использования при количественном определении.

Для экстракции ДНК использовалась процедура, предусмотренная в [*26*]. 200 мг материала образца было лизировано в 1 см^3 буфера гуанидингидрохлорид/протеиназа К (0,5 ммоль/дм^3; 0,8 мг/см^3) при *температуре* 56 °С в течение трех ч. После стадии обработки РНКазой 500 мкл очищенного экстракта смешивалось с 1 см^3 силиконовой смолы Wizard®, и смола со связанной ДНК возвращалась путем отсасывания через колонку с фильтром Wizard®. После промывания изопропанолом ДНК элюировали с силиконовой смолы 10 ммоль/дм^3 Трис-буфером pH 9,0 при температуре 70 °С. Концентрацию ДНК оценивали с помощью измерения оптической плотности при 260 нм и приводили к уровню 20 мкг/см^3. Для последующего ПЦР-анализа 200 нг ДНК из каждого образца были проанализированы в двух независимых реакциях.

Образцы анализировались в двух повторностях.

Поскольку образцы, помеченные SA—SE, представляли собой смеси этих различных стандартов, результаты, полученные с помощью этих образцов, не могут быть использованы для оценки истинности предложенного метода ПЦР в реальном времени. Однако эти результаты могут быть использованы для оценки точности этих методов, в силу чего описанные обстоятельства отражают наихудший вариант, ведущий к недооценке точности прикладного метода ПЦР в реальном времени [*22*].

Исключение лабораторий основано на использовании приборов ПЦР в реальном времени и статистическом расчете «выбросов». Метод был разработан для блочных термоциклеров. Поэтому две лаборатории, использовавшие системы LightCycler® (Roche Diagnostics), были исключены еще до расчета «выбросов». Причина исключения определенных приборов для ПЦР состояла в наблюдении, что прикладной метод нуждается в тщательной адаптации и оптимизации в том случае, если он проводится на приборе для ПЦР в реальном времени, отличном от того, который изложен в методе. Оставшиеся лаборатории были, кроме того, проверены на выбросы по Граббсу [*27*]. Однако не было обнаружено ни одного выброса. Подробности совместного испытания лабораторий приведены в таблице С.1.

Таблица С.1 — Данные валидации 35S-промотор-специфического обнаружения ГМО в 1999 г.

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

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

С.1.2.3 Молекулярная специфичность

С.1.2.3.1 Общие положения

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

С.1.2.3.2 Теоретическая специфичность

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

С.1.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Экспериментальная специфичность метода была оценена путем анализа ССМ IRMM-410 из высушенной соевой муки производства IRMM, содержащей от 0 % до 5 % сои линии GTS 40-3-2 и стандартного материала фирмы Leatherhead Food Research Association International — *необезжиренной* соевой муки (Lot No. 2/99-01), содержащей 0 %, 0,3 %, 1,25 % и 2 % сои линии GTS 40-3-2, соответственно.

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

С.1.2.4 Оптимизация

Оптимизация была проведена для системы детектирования последовательностей (СДП) ABI PRISM 7700® и набора TaqMan® химия.

Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.1.2.5 Предел детектирования (LOD)

Поскольку метод является количественным, LOD прямо не оценивался. LOD должен быть лучше или равным пределу количественного определения, т. е. 50 геномных копий сои линии GTS 40-3-2 в 82000 геномных копиях обычной соевой муки.

С.1.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Предел количественного определения был определен путем измерения серии разбавлений целевой ДНК, как описано в [*23*]. В соответствии с рекомендациями разработчика метода предел количественного определения составляет 50 геномных копий сои линии GTS 40-3-2 в 82000 геномных копиях обычной соевой муки. Значение 1С

см. в [23]. В соответствии с этими данными оцененный относительный LOQ составляет 0,06 (= 50 копий/82000 копий × 100 %).

Концентрации, исследованные в совместном испытании лабораторий, приведены в таблице С.1.

Примечание — Число копий в совместном испытании лабораторий не определялось.

С.1.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

С.1.4 Принцип

Фрагмент последовательности трансгена, использованного для конструирования сои линии GTS 40-3-2, размером 83 п. о., амплифицированный с помощью ПЦР двух праймеров, специфических для гена CTP из *Petunia hybrida* (RRS-F, см. таблицу С.2) и к 35S-промотора (RRS-R, см. таблицу С.2). ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для соединения гена CTP и 35S-промотора (см. таблицу С.2, RRS-TMP). Этот олигонуклеотидный зонд помечен двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся *набор* TaqMan® химия.

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

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

С.1.5 Реактивы

С.1.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве используемых реактивов см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6*).

С.1.5.2 Вода.

С.1.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10×.

С.1.5.4 Раствор $MgCl_2$, $c(MgCl_2)$ = 25 ммоль/дм^3.

С.1.5.5 Раствор дНТФ, c(дНТФ) = 2,5 ммоль/ дм^3 (каждый).

С.1.5.6 Олигонуклеотиды

Характеристики применяемых олигонуклеотидов приведены в таблице С.2.

Таблица С.2 — Олигонуклеотиды

Наименование олигонуклеотида	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность референсного гена		
Лектин-F	5′-TCC ACC CCC ATC CAC ATT T-3′	900 нмоль/дм^3
Лектин-R	5′-ggC ATA gAA ggT gAA gTT gAA ggA-3′	900 нмоль/дм^3
Лектин-TMP	5′-FAM-AAC Cgg TAg CgT TgC CAg CTT Cg-TAMRA-3′[a]	100 нмоль/дм^3
Целевая последовательность ГМО		
RRS-F	5′-gCC ATg TTg TTA ATT TgT gCC AT-3′	900 нмоль/дм^3
RRS-R	5′-gAA gTT CAT TTC ATT Tgg AgA ggA C-3′	900 нмоль/дм^3
RRS-TMP	5′-FAM-CTT gAA AgA TCT gCT AgA gTC AgC TTg TCA gCg-TAMRA-3′[a]	100 нмоль/дм^3
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Длина лектинового ПЦР-продукта составляет 81 п. о.; длина ПЦР-продукта RRS составляет 83 п. о.

С.1.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold®.

С.1.5.8 Урацил-N-гликозилаза (необязательно).

С.1.6 Прибор

С.1.6.1 Общие положения

Следует использовать стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

С.1.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль изначально был оттестирован при помощи приборов СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) и СДП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы СДП ПЦР в реальном времени после адаптации реакционных условий.

С.1.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (*восемь* крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

С.1.6.4 Процедура: порядок проведения ПЦР

Порядок проведения ПЦР для целевой последовательности референсного гена и целевой последовательности ГМО *следует* проводить в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод приведен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 50 мкл с реактивами, приведенными в таблице С.3.

Таблица С.3 — Окончательный объем реакционной смеси амплификации/концентрация на одну реакционную пробирку

Целевая последовательность референсного гена		
Суммарный объем		50 мкл
Кодирующая нить ДНК (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[a]	1×
$MgCl_2$		5 ммоль/дм^3
Праймеры	Лектин-F и Лектин-R (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонд	Лектин-TMP (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
Целевая последовательность ГМО		
Суммарный объем		50 мкл
Кодирующая нить ДНК (максимальное количество 200 нг)		10 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[a]	1×
$MgCl_2$		5 ммоль/дм^3
Праймеры	RRS-F и RRS-R (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонд	RRS-TMP (см. таблицу С.2)	См. таблицу С.2
[a] ROX — карбокси-Х-родамин.		

С.1.6.5 Контроли ПЦР

В качестве положительного контроля и стандартного материала для калибровки могут быть использованы сертифицированные стандартные материалы GTS 40-3-2 (материалы, содержащие от 0,1 % до 5 % генетически модифицированной сои), производимые IRMM, Geel, Бельгия (серии IRMM-410) [*21*].

Следует провести все соответствующие контроли, как это предусмотрено в *ГОСТ Р 53214.*

С.1.6.6 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.4, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В исследовании по подтверждению достоверности метода СДП ABI PRISM® 7700 использовался совместно с AmpliTaq Gold® ДНК-полимеразой. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Температура и время, необходимые для активации/инициации денатурации, зависят от особенностей используемой полимеразы.

Условия реакции приведены в таблице С.4.

Таблица С.4 — Процедура: условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	60

С.1.7 Ограничения и интерпретация результатов

Поскольку ГМО иные, чем соя линии GTS 40-3-2, они могут содержать часть трансгена, использовавшегося для конструирования сои линии GTS 40-3-2, в частности, 35S-промотор, CTP-последовательность из *Petunia hybrida* и специфический участок соединения между этими двумя генетическими элементами, метод пригоден для количественного определения ДНК сои линии GTS 40-3-2 в отсутствие других ГМО, как определено выше.

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

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

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

С.1.8 Калибровка и расчет результатов

После определения порогового *значения* [например, от 0,01 до 0,1 нормализованной флуоресценции репортерного красителя (R_n)] система детектирования последовательностей рассчитывает значения C_t (*число* пороговых циклов) для каждой ПЦР (метод $\Delta\Delta C_t$). Рассчитывают различия между значениями C_t образцов ($\Delta C_{t,\,обр}$) и стандартных образцов ($\Delta C_{t,\,ст}$). Относительное количество ДНК сои линии GTS 40-3-2 в образце *w*, %, относительно стандартного материала рассчитывают по формуле

$$w = 2^{-(\Delta C_{t,\,обр} - \Delta C_{t,\,ст})} \cdot c_{ст}, \qquad (С.1)$$

где $c_{ст}$ — концентрация стандартного образца.

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

Для этой альтернативной процедуры для расчета результатов важно, чтобы абсолютное количество кодирующей нити ДНК (нг) было одинаковым для каждой ПЦР, использованной для калибровки.

Другая альтернативная процедура приведена в С.2.

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

С.2.1 Введение

В этом приложении приведен метод специфической амплификации и обнаружения таксон-специфического гена сои (ген лектина, le1) и специфического участка генной конструкции — места соединения ДНК 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты и хлоропластного сигнала *Petunia hybrida*, предшествующего последовательности гена 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат-синтазы *Agrobacterium* (*epsps*), присутствующего в генетически модифицированной сое линии GTS 40-3-2 (Roundup Ready®) для количественного определения относительного количества ДНК, происходящей из генетически модифицированной сои линии GTS 40-3-2.

Ограничения см. в С.2.8.

С.2.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.2.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для приборов для ПЦР в реальном времени с использованием сертифицированных стандартных материалов (CCM IRMM-410R) [*21*], состоящих из высушенной муки соевых бобов, включающих смеси сои линии GTS 40-3-2 и обычной сои.

Воспроизводимость и точность приведенного метода была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием неизвестных образцов, состоявших из упомянутых выше стандартных материалов. Кроме того, были протестированы обработанные стандартные материалы текстурированного растительного белка (ТРБ).

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

С.2.2.2 Совместные испытания лабораторий

Шесть неизвестных образцов, содержавших от 0,1 % до 5 % (по массе) упомянутых выше сертифицированных стандартных материалов (CCM IRMM-410R) и ТРБ, содержавшего 2 % (по массе) сои линии GTS 40-3-2, были проанализированы:

- 14 лабораториями, использовавшими СДП ABI PRISM® 7700,
- шестью лабораториями, использовавшими СДП ABI GeneAmp® 5700,
- 12 лабораториями, использовавшими систему LightCycler® (Roche Diagnostics).

Число участников, как и число образцов, было в соответствии с *ГОСТ Р 5725-6*.

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

Для экстракции ДНК использовалась процедура, описанная в ИСО 21571 [*2*], раздел А.3.

Для каждого образца параллельно анализировались два экстракта ДНК. Каждый испытательный образец был проанализирован в трех повторностях.

Точность метода, достоверность и предел количественного определения определялись в ходе совместного испытания лабораторий. Данные специфичности, линейности и пределов детектирования и количественного определения были установлены до совместного испытания лабораторий. Содержание ДНК в испытательных образцах охватывало эти величины.

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

Таблица С.5 — Данные валидации для СДП ABI PRISM® 7700 и СДП ABI GeneAmp® 5700 за 2000 год

Наименование показателя	Образец 1 0,10 % ± 0,03 %	Образец 2 0,50 % ± 0,06 %	Образец 3 1,0 % ± 0,1 %	Образец 4 2,0 % ± 0,2 %	Образец 5 5,0 % ± 0,2 %	Образец 6 2 % ТРБ
Число участвовавших лабораторий	19	19	19	19	19	19
Число выбросов[a]	0	2	1	0	1	0
Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	19	17	18	19	18	19
Среднее значение, %	0,11	0,49	1,00	2,27	5,11	1,71
Стандартное отклонение повторяемости s_r[a]	0,04	0,12	0,21	0,25	0,53	0,48
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	33	24	21	11	10	28
Предел повторяемости r (r = 2,8 s_r)	0,10	0,33	0,59	0,71	1,48	1,34

Окончание таблицы С.5

Наименование показателя	Образец 1 0,10 % ± 0,03 %	Образец 2 0,50 % ± 0,06 %	Образец 3 1,0 % ± 0,1 %	Образец 4 2,0 % ± 0,2 %	Образец 5 5,0 % ± 0,2 %	Образец 6 2 % ТРБ
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R[a]	0,05	0,3	0,28	0,71	1,38	0,55
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	44	27	28	32	27	32
Предел воспроизводимости R (R = 2,8 s_R)	0,13	0,37	0,77	2,00	3,87	1,54
[a] Выбросы были идентифицированы с помощью тестов Граббса и Кохрана [27].						

Т а б л и ц а С.6 — Данные валидации для системы LightCycler® за 2000 год

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

Результаты, приведенные в таблице С.6, иллюстрируют вариабельность, наблюдавшуюся для системы LightCycler® (Roche Diagnostics).

С.2.2.3 Молекулярная специфичность

С.2.2.3.1 Общие положения

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

С.2.2.3.2 Теоретическая специфичность

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

С.2.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

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

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

Аллельная стабильность и стабильность числа копий референсного соевого гена была оценена с использованием по крайней мере восьми сортов сои.

С.2.2.4 Оптимизация

Оптимизация концентраций реактивов была проведена для системы детектирования последовательностей (СДП) ABI PRISM 7700® и прибора LightCycler® с использованием набора TaqMan® химия [*5*]. Никакой дополнительной оптимизации не производили для прибора GeneAmp® 5700, поскольку термоциклер в этом инструменте идентичен термоциклеру в ABI PRISM 7700®.

Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.2.2.5 Предел детектирования (LOD)

Предел детектирования в ходе совместного испытания лабораторий не оценивался. Предел детектирования для ПЦР рассчитывался с помощью измерения серии разбавлений целевой ДНК. В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что LOD составлял *пять* копий целевой последовательности (определен с помощью плазмид).

С.2.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

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

В соответствии с рекомендациями разработчика метода предел количественного определения составляет по крайней мере 50 геномных копий сои линии GTS 40-3-2. Значение 1С см. в [*23*].

Концентрации, исследованные в совместном испытании лабораторий, приведены в таблицах С.5 и С.6.

Примечание — Число копий в совместном испытании лабораторий не определялось.

С.2.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

С.2.4 Принцип

Фрагмент последовательности, специфической для конструкции сои линии GTS 40-3-2, размером 74 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР пары праймеров, специфических для сои линии GTS 40-3-2. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции сои линии GTS 40-3-2, меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся *набор* TaqMan® химия.

Фрагмент последовательности таксон-специфического гена лектина сои (le1) размером 74 п. о. был амплифицирован с помощью ПЦР в отдельной реакции ПЦР в реальном времени с использованием двух праймеров, специфических к гену соевого лектина *le*1, и продукты ПЦР измерялись в течение каждого цикла ПЦР с применением зонда, специфического к гену *le*1, производства TaqMan®.

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

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

С.2.5 Реактивы

С.2.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве используемых реактивов см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6*).

С.2.5.2 Вода.

С.2.5.3 Буфер для ПЦР (без $MgCl_2$), 10×.

С.2.5.4 Раствор $MgCl_2$, $c(MgCl_2)$ = 25 ммоль/дм^3.

С.2.5.5 Раствор дНТФ, c(дНТФ) = 2,5 ммоль/ дм^3.

С.2.5.6 Олигонуклеотиды

Характеристики применяемых олигонуклеотидов приведены в таблице С.7.

Таблица С.7 — Олигонуклеотиды

Наименование олигонуклеотидов	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность референсного гена		
GM1-F	5′-CCA gCT TCg CCg CTT CCT TC-3′	600 нмоль/дм^3
GM1-R	5′-Gaa ggC AAg CCC ATC TgC AAg CC-3′	600 нмоль/дм^3
GM1-зонд	5′-FAM-CTT CAC CTT CTA TgC CCC TgA CAC-TAMRA-3′[a]	120 нмоль/дм^3
Целевая последовательность ГМО		
RR1- F	5′-CAT TTg gAg Agg ACA CgC TgA-3′	600 нмоль/дм^3
RR1-R	5′-gAg CCA TgT TgT TAA TTT gTg CC-3′	600 нмоль/дм^3
RR1-зонд	5′-FAM-CAA gCT gAC TCT TTC-TAMRA-3′[a]	125 нмоль/дм^3

[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.

Длина лектинового ПЦР-продукта и ПЦР-продукта сои линии GTS 40-3-2 составляет 74 п. о.

С.2.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

НК-полимераза AmpliTaq Gold®.

С.2.5.8 Урацил-N-гликозилаза (необязательно).

С.2.6 Прибор

С.2.6.1 Общие положения

Следует использовать стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

С.2.6.2 Термоциклер

Отмеченные температурно-временные профили исходно были оттестированы при помощи приборов СДП ABI PRISM® 7700 или СДП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems), или системой LightCycler® (Roche Diagnostics). *Допускается* использовать другие системы ПЦР в реальном времени, если они могут показать эквивалентные или лучшие результаты.

С.2.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (*восемь* крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems) и капилляры LightCycler® (Roche Diagnostics).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

С.2.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

С.2.7.1 Общие положения

Порядок проведения ПЦР для целевой последовательности референсного гена и целевой последовательности ГМО следует проводить в отдельных пробирках.

Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

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

Метод приведен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 50 мкл с реактивами, приведенными в таблицах С.8 и С.9.

Таблица С.8 — Реакционная смесь амплификации, окончательный объем и концентрации в расчете на одну реакционную пробирку для целевой таксон-специфической последовательности

Суммарный объем		50 мкл
Добавленная кодирующая нить ДНК (от 1,7 до 108 нг соевой ДНК)		5 мкл
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [a]	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза	400 мкмоль/ дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[b]	1×
$MgCl_2$		4,5 ммоль/дм^3
Праймеры	GM1-F и GM1-R (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонд	GM1 (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
H_2O (для молекулярной биологии)		Добавляется до 50 мкл

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

Таблица С.9 — Реакционная смесь амплификации, окончательный объем и концентрации в расчете на одну реакционную пробирку для целевой последовательности ГМО

Суммарный объем		50 мкл
Добавленная кодирующая нить ДНК (от 1,7 до 108 нг соевой ДНК)		5 мкл
ДНК-полимераза	ДНК-полимераза AmpliTaq Gold® [a]	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза	400 мкмоль/ дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[b]	1×
$MgCl_2$		4,5 ммоль/дм^3
Праймеры	RR1-F и RR1-R (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонд	RR1 (см. таблицу С.7)	См. таблицу С.7
H_2O (для молекулярной биологии)		Добавляется до 50 мкл

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

С.2.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительного контроля могут быть использованы сертифицированные стандартные материалы генетически модифицированной сои GTS 40-3-2, производимые IRMM, Geel, Бельгия (серии IRMM-410) [*21*].

Следует провести все соответствующие контроли, как это описано в *ГОСТ Р 53214.*

С.2.7.3 Температурно-временная программа

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

Условия реакции приведены в таблице С.10.

Таблица С.10 — Процедура: условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация (необязательно)		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15[a]/5[b]	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60[a]/25[b]	60

[a] Оптимизировано для ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems).
[b] Оптимизировано для системы LightCycler®. Параметры флуоресценции в LightCycler® — канал 1 (коэффициент усиления 4) и единичный сбор данных с программным обеспечением версии 3.

С.2.8 Ограничения и интерпретация результатов

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

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

Этот метод был валидирован для соевой муки и текстурированного растительного белка.

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

С.2.9 Калибровка и расчет результатов

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

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

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

Раздел С.3. Не включен (см. предисловие).

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

С.4.1 Введение

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

Примечание — *Cf* используется для расчета содержания ГМО (мас. %) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. *Cf* может быть измерен как отношение числа копий для целе-

вой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего стандартного материала.

Ограничения см. в С.4.8.

С.4.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.4.2.1 Общие положения

Этот метод был оптимизирован для приборов СДП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды pMulSL2 в качестве стандартного материала [*28*]. Плазмида pMulSL2 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из соевых бобов (*Le1)* и последовательности, специфической для конструкции сои линии GTS 40-3-2.

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

Воспроизводимость и точность описанного метода была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием стандартных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян сои, содержавших смеси сои линии GTS 40-3-2 и обычной сои [*29*].

Число копий таксон-специфической последовательности (Le1*)* в расчете на геном оценивалось для 10 представительных разновидностей сои.

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [*30*], [*31*], [*32*], [*33*].

С.4.2.2 Совместные испытания лабораторий

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

Примечание — Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей соевой муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1, 5 % и 10 % (по массе) сухой соевой муки, полученной из сои линии GTS 40-3-2. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [*34*].

Валидация метода для GTS 40-3-2 была проведена путем совместного испытания лабораторий в соответствии с протоколом AOAC [*29*], [*34*]. Совместное испытание лабораторий было организовано Национальным институтом исследования продуктов питания (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям, Saitama, Япония, и Национальным институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences), Япония. 15 участников из Японии, Республики Корея и Соединенных Штатов Америки проводили это совместное испытание с использованием СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР. Первая стадия имела своей целью определение Cf для GTS 40-3-2. Все участники получили набор праймеров, зондов, стандартный материал и ДНК, экстрагированную из семян сои линии GTS 40-3-2, которые были приготовлены Qiagen DNA Easy Plant Maxikit. Эта ДНК использовалась для измерения числа копий в каждой специфической для конструкции и таксон-специфической для сои последовательности ДНК. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 135 данных. Корреляции калибровочных кривых, к которым были приложены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0{,}990$). В соответствии с протоколом AOAC [*34*], лаборатории, чьи данные были признаны «выбросами», должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0{,}025$) и экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0{,}025$). Ни одного «выброса» не наблюдалось, как это показано в таблице С.*11*.

Таблица С.*11* — Сводные данные *Cf*

Целевая последовательность	Последовательность, специфическая для конструкции GTS 40-3-2
Число участвовавших лабораторий	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Число оставшихся лабораторий	15
Cf[a]	0,95 ± 0,02
[a] Выражено как среднее значение ± доверительный интервал (α = 0,05).	

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

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

13 лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 156 образцов путем амплификации Le1 и последовательности, специфической для конструкции. Лаборатории, которые не смогли определить, что «пустые» образцы содержат 0 % сои линии GTS 40-3-2, были расценены как неработоспособные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми (r > 0,990). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями GTS 40-3-2, были исключены из испытания как выбросы по Кохрану [*35*] и по Граббсу [*36*], соответственно, еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных не обнаружено выбросов ни по Кохрану, ни по Граббсу. Рассчитанное среднее значение *содержания ГМО*, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости (%) и относительное стандартное отклонение воспроизводимости (%) для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.*12*.

Примечание — Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения *Cf*, определенного в ходе первой стадии совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении величины *Cf* и проведении «слепых» анализов, было передано в NFRI, и содержание ГМО (%) в «слепых» испытательных образцах было преобразовано в окончательные результаты с использованием значения *Cf*.

Таблица С.*12* — Данные валидации для количественного определения последовательности, специфической для конструкции GTS 40-3-2

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

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

С.4.2.3 Молекулярная специфичность

С.4.2.3.1 Общие положения

Этот метод был приведен в [*28*]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном сои, доступна в [*28*] и [*25*]. Последовательности ДНК для разработки этого метода могут быть получены, например, в DDBJ, регистрационный номер базы данных X04879, в отчете [*37*] и в патенте Соединенных Штатов Америки, номер 5633435.

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

С.4.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов была оценена путем поиска в базах данных DDBJ [3 декабря 1999 г.] и документация по оценке безопасности была опубликована Министерством здоровья, труда и благополучия (Япония) и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства (Япония) с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.4.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании с образцами высушенной соевой муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ сои линии GTS 40-3-2, которые были приготовлены для этого метода NFRI [*28*], [*29*].

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

С.4.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов была проведена для СДП ABI PRISM 7700® с использованием *набора* TaqMan® химия [*38*].

Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.4.2.5 Предел детектирования (LOD)

Абсолютный предел детектирования в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOD, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,1 % сои линии GTS 40-3-2.

С.4.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала.

Относительный LOQ, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,1 % сои линии GTS 40-3-2.

С.4.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

С.4.4 Принцип

Фрагмент последовательности, специфической для конструкции сои линии GTS 40-3-2, размером 121 п. о. амплифицировали с помощью ПЦР пары праймеров, специфических для GTS 40-3-2. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции GTS 40-3-2, меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся *набор* TaqMan® химия.

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

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного испытательного образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой праймер/зонд генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые составляли из пяти концентраций, включая 20, 125, 1500, 20000, 250000 копий ДНК плазмиды pMulSL2. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на ABI PRISM® 7700 SDS (Applied Biosystems) в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t («порогового цикла»), определенных для калибровочных точек в специфической для *Le*1 или целевой последовательности конструкции GTS 40-3-2, соответственно, от логарифма числа копий ДНК плазмиды pMulSL2 [*28*], использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное

для ДНК испытательного образца, получается путем интерполяции из стандартных кривых. Для определения количества (в процентах) GTS 40-3-2 в испытательном образце число копий конструкции GTS 40-3-2 делится на число копий гена *Le*1 и значений C_t, специфическую для конструкции GTS 40-3-2, умноженную на 100, как описано в разделе С.4.9.

С.4.5 Реактивы

С.4.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6)*.

С.4.5.2 Вода.

С.4.5.3 TaqMan® Universal Master Mix, 2×.

С.4.5.4 Стандартный материал (плазмида).

Стандартным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMulSL2 [*28*], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ сои (RRS; Fasmac № PS-2 и Nippon Gene № 310-04981).

С.4.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов, специфических для конструкции и таксон-специфических генов сои линии GTS 40-3-2, приведены в таблице С.*13*.

Таблица С.*13* — Олигонуклеотиды

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

Длина лектинового ПЦР-продукта составляет 118 п. о.; длина ПЦР-продукта GTS 40-3-2 составляет 121 п. о.

С.4.6 Прибор

С.4.6.1 Общие положения

Следует использовать стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

С.4.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль исходно был оттестирован в ходе совместного испытания лабораторий с прибором СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.4.6.3 Реакционные плашка и микропробирки

Реакционные плашка и микропробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (восемь крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems), соответственно.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

С.4.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

С.4.7.1 Общие положения

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

Метод приведен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 25 мкл с реактивами, приведенными в таблицах С.*14* для *Le*1 и С.*15* для GTS 40-3-2.

Таблица С.*14* — Реакционная смесь амплификации в окончательном объеме на одну реакционную пробирку для целевой таксон-специфической последовательности *Le*1

Суммарный объем реакции		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК сои)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	TaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI)	12,5 мкл
Праймеры	*Le*1n02-5′ и *Le*1n02-3′ (см. таблицу С.*13*)	См. таблицу С.*13*
Зонд	*Le*1-Taq (см. таблицу С.*13*)	См. таблицу С.*13*

Таблица С.*15* — Реакционная смесь амплификации для специфической последовательности GTS 40-3-2 в окончательном объеме в расчете на одну реакционную пробирку

Суммарный реакционный объем		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК сои)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	RRS 01-5′ и RRS 01-3′ (см. таблицу С.*13*)	См. таблицу С.*13*
Зонд	RRS-Taq (см. таблицу С.*13*)	См. таблицу С.*13*

С.4.7.2 Контроли ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все контроли, как это определено в *ГОСТ Р 53214.*

Если контроли не дадут ожидаемых результатов, результаты испытаний должны быть забракованы, и анализ должен быть повторен.

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

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

b) плазмида, содержащая целевую (ые) последовательность(и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Soybean (RRS) Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 and Nippon Gene No. 310-04981 [*28*].

В соответствии с требованиями обеспечения качества положительные контроли предпочтительно не должны быть теми же самыми, что и стандартные калибровочные материалы.

С.4.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.*16*, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В валидационном исследовании он использовался совместно с универсальной смесью для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.*16* — Процедура: условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	1530	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	59

С.4.8 Ограничения и интерпретация результатов

Так как разные линии ГМ-сои, а не только соя линии GTS 40-3-2, могут содержать ту же самую специфическую для конструкции последовательность ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК сои линии GTS 40-3-2 в отсутствие ГМО иных, чем соя линии GTS 40-3-2.

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

Совместное испытание лабораторий является значимым источником данных для обеспечения оценки погрешности. Также необходимо идентифицировать любые источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, такими как отбор проб и др., в соответствии с основными международными договоренностями [*39*], [*40*].

С.4.9 Калибровка и расчет результатов

Исследователем должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t). Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве производителя к стандартным материалам ГМ-сои [GM Soybean (RRS) Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 310-04981]. См. также [*28*].

Конверсионный фактор *(Cf)* для количественного определения конструкции, специфической для сои линии GTS 40-3-2 и референсной плазмиды, использовавшихся в совместном испытании лабораторий, равен 0,95. Расчет количества RRS в образце сои *w*, %, проводят по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \cdot \frac{100}{Cf}, \qquad (C.2)$$

где N_{GM} — число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца;

N_{TX} — число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца.

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

С.5.1 Введение

В этом приложении приведен метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, IIb: *zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции — места соединения последовательности интрона гена белка теплового шока 70 *(БТШ70)* кукурузы и синтетического гена *cryIA*(b), происходящего из *Bacillus thuringiensis*, присутствующего в генетически модифицированной (ГМ) кукурузе линии MON 810, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве стандартного материала для количественного определения количества MON 810 с применением конверсионного фактора (*Cf*), представляющего собой отношение числа копий, специфических для конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии MON 810.

Примечание — *Cf* используется для расчета содержания ГМО (мас. %) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. *Cf* может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего стандартного материала.

Ограничения см. в С.5.8.

С.5.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.5.2.1 Общие положения

Этот метод был оптимизирован для приборов СДП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды pMul5 в качестве стандартного материала [*28*]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS) и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

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

Воспроизводимость и точность описанного метода была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием стандартных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержавших смеси зерен линии MON 810 и обычной кукурузы [*29*].

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

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [*30*], [*31*], [*32*], [*33*].

С.5.2.2 Совместные испытания лабораторий

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

Примечание — Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для совместного испытания лабораторий были использованы семена образца линии MON 810, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [*29*], [*34*].

Валидация метода для кукурузы линии MON 810 была проведена путем совместного испытания лабораторий в соответствии с протоколом AOAC [*34*]. Совместное испытание лабораторий было организовано Национальным Институтом исследования продуктов питания (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям, Саитама (Saitama), Япония и Национальным Институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences), Токио, Япония. 15 лабораторий, включая участников из Японии, Республики Корея и Соединенных Штатов Америки, проводили это совместное испытание с использованием СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Первая стадия имела своей целью определение *Cf* для MON 810. Все участники получили набор праймеров, зондов, стандартный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии MON 810, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции специфической для MON 810 и таксон-специфической *zSSIIb* последовательности ДНК кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0{,}990$). В соответствии с протоколом AOAC [*34*], лаборатории, чьи данные были признаны «выбросами», должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0{,}025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0{,}025$). После обоих тестов одна лаборатория была выявлена как по Кохрану по соотношению конструкции специфической для MON 810 и таксон-специфической последовательности *zSSIIb*. Ни одного выброса не наблюдалось по другим соотношениям, как это показано в таблице С.*17*.

Таблица С.*17* — Сводные данные *Cf* для MON 810

Целевая последовательность	Последовательность, специфическая для конструкции MON 810
Число участвовавших лабораторий	15
Число выбросов по тесту Кохрана	1
Число выбросов по тесту Граббса	0
Число оставшихся лабораторий	14
Cf [a]	0,38 ± 0,01
[a] Выражено как среднее значение ± доверительный интервал ($\alpha = 0{,}05$).	

Величина *Cf* может быть повторно определена исследователями с использованием подходящих стандартных материалов кукурузы линии MON 810.

На второй стадии были проведены «слепые» анализы. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии MON 810 в смеси с обычной кукурузной мукой. Образец, содержавший 0 % кукурузы линии MON 810, был использован как «пустой» образец, чтобы отсеять неработоспособные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen. Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения и доверительного интервала ($\alpha = 0{,}05$). Средние значения были определены как *Cf* для расчета количества ГМО (в %) в ходе «слепого» анализа. Среднее значение *Cf* для количественного определения последовательности, специфической для конструкции MON 810, составляло 0,38.

14 лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности, специфической для конструкции MON 810. Лаборатории, которые не смогли определить, что «пустые» образцы не содержат кукурузы линии MON 810 (0 %), были расценены как неработоспособные, и

все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми ($r > 0,990$). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями MON 810, были исключены из испытания, как выбросы по Кохрану и выбросы Граббса [*35*], [*36*], соответственно, еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных обнаружено пять выбросов по Кохрану и один выброс по Граббсу. Рассчитанное среднее значение содержания ГМО, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости (%) и относительное стандартное отклонение воспроизводимости (%) для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.*18* [*29*].

Примечание — Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения *Cf*, определенного в ходе первой стадии совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения *Cf* и проведении «слепых» анализов, было передано в NFRI и содержание ГМО (%) в «слепых» испытательных образцах было преобразовано в окончательные результаты с использованием значений *Cf*.

Таблица С.*18* — Данные валидации для количественного определения последовательности, специфической для конструкции кукурузы MON 810

Наименование показателя	Доля ГМ-кукурузы линии MON 810 в смеси, %				
	0,1	0,5	1	5	10
Число участвовавших лабораторий	14	14	14	14	14
Число неработоспособных лабораторий	0	0	0	0	0
Число выбросов по Кохрану	2	1	0	1	1
Число выбросов Граббсу	1	0	0	0	0
Число лабораторий, оставшихся после исключения	11	13	14	13	13
Среднее значение содержания ГМО, %	0,1	0,5	1,0	4,8	9,8
Отклонение от истинного значения, %	+25,0	+9,4	+4,6	–4,3	–1,8
Стандартное отклонение повторяемости s_r [a]	0,040	0,082	0,124	0,647	1,028
Предел повторяемости r [a] ($r = 2,8\ s_r$)	0,113	0,231	0,347	1,813	2,879
Относительное стандартное отклонение повторяемости, % [b]	13,4	12,0	11,2	7,6	8,5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R [a]	0,040	0,107	0,158	0,647	1,140
Предел воспроизводимости R [a] ($R = 2,8 \times s_R$)	0,113	0,301	0,443	1,813	3,191
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, % [b]	32,3	19,6	15,1	13,5	11,6
Ниже 20 копий[c] (абсолютный предел детектирования этого метода)	19/22	0/26	0/28	0/26	0/26

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

С.5.2.3 Молекулярная специфичность

С.5.2.3.1 Общие положения

Этот метод был приведен в [*28*]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, доступна в [*28*] и [*41*]. Праймеры и зонды TaqMan® для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, изложенной в ссылке [*41*].

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

С.5.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов была оценена путем поиска в базах данных DDBJ (3 декабря 1999 г.), и документация по оценке безопасности была опубликована Министерством здоровья, труда и благополучия (Япония) и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства (Япония) с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.5.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании с образцами высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии MON 810, которые были приготовлены для этого метода NFRI [*28*], [*29*].

Испытанными образцами были зерна кукурузы, кукурузная крупа, кукурузная мука грубого и тонкого помолов.

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

С.5.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов была проведена для СДП ABI PRISM 7700® с использованием набора TaqMan® химия [*38*].

Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.5.2.5 Предел детектирования (LOD)

Абсолютный предел детектирования в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOD, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,5 % кукурузы линии MON 810.

С.5.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOQ, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,5 % кукурузы линии MON 810.

С.5.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

С.5.4 Принцип

Фрагмент последовательности, специфической для конструкции кукурузы линии MON 810, размером 113 п. о. амплифицировали с помощью ПЦР пары праймеров, специфических для MON 810. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции MON 810, меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся *набор* TaqMan® химия.

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

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного испытательного образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой праймер/зонд генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые составляли из пяти концентраций, включая 20, 125, 1500, 20000, 250000 копий ДНК плазмиды pMul5 [*28*]. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на ABI PRISM® 7700 SDS (Applied Biosystems) в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t («порогового цикла»), определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции MON 810, соответственно, от логарифма числа копий ДНК плазмиды pMul5 [*28*] использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное для ДНК испытательного образца, получается путем интерполяции из стандартных кривых. Для определения количества MON 810 в испытательном образце число копий конструкции MON 810 делится на число копий конструкции *zSSIIb* и значение *Cf*, специфическое для конструкции MON 810, умноженное на 100, как описано в разделе С.5.9.

С.5.5 Реактивы

С.5.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве используемых реактивов см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6).*

С.5.5.2 Вода.

С.5.5.3 TaqMan® Universal Master Mix, 2×.

С.5.5.4 Стандартный материал (плазмида).

Стандартным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода служила плазмида pMul5 [*28*], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981). Могут быть использованы и другие стандартные материалы, если они могут продемонстрировать такие же или лучшие результаты.

С.5.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов, специфических для конструкции линии MON 810 и таксон-специфических генов кукурузы, приведены в таблице С.*19*.

Таблица С.*19* — Олигонуклеотиды

Наименование олигонуклеотида	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5′	5′-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3′	500 нмоль/дм^3
SSIIb 1-3′	5′-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3′	500 нмоль/дм^3
SSIIb -Taq	5′-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3′[a]	200 нмоль/дм^3
Целевая последовательность ГМО		
MON810 2-5′	5′- gAT gCC TTC TCC CTA gTg TTg A-3′	500 нмоль/дм^3
MON810 2-3′	5′- ggA TgC ACT CgT TgA TgT TTg-3′	500 нмоль/дм^3
MON810-Taq	5′-FAM- AgA TAC CAA gCg gCC ATg gAC AAC AA-TAMRA-3′[a]	200 нмоль/дм^3
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Длина ПЦР-продукта SSIIb составляет 151 п. о.; длина ПЦР-продукта MON 810 составляет 113 п. о.

С.5.6 Прибор

С.5.6.1 Общие положения

Следует использовать стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

С.5.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль исходно был оттестирован в ходе совместного испытания лабораторий с прибором СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.5.6.3 Реакционные плашка и микропробирки

Реакционные плашка и микропробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (восемь крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems), соответственно. Допускается использование других реакционных плашек, микрофлаконов или микропробирок, если они могут продемонстрировать такие же или лучшие результаты.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

С.5.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

С.5.7.1 Общие положения

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

Метод приведен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 25 мкл с реактивами, приведенными в таблицах С.*20* для *zSSIIb* и С.*21* для MON 810.

Таблица С.*20* — Реакционная смесь амплификации в окончательном объеме на одну реакционную пробирку для целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb*

Суммарный объем реакции		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК полимеразу и дНТФ)	TaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI)	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*-5′ и *zSSIIb*-3′ (см. таблицу С.*19*)	См. таблицу С.*19*
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.*19*)	См. таблицу С.*19*

Таблица С.*21* — Реакционная смесь амплификации для специфической последовательности MON 810 в окончательном объеме в расчете на одну реакционную пробирку

Суммарный реакционный объем		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	MON 810 2-5′ and MON 810 2-3′ (см. таблицу С.*19*)	См. таблицу С.*19*
Зонд	MON 810-Taq (см. таблицу С.*19*)	См. таблицу С.*19*

С.5.7.2 Контроли ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все контроли, как это определено в *ГОСТ Р 53214.*

Если контроли не дадут ожидаемых результатов, результаты испытаний должны быть забракованы и анализ должен быть повторен.

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

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

b) плазмида, содержащая целевую последовательность (и) может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 310-04981) [*28*].

В соответствии с требованиями обеспечения качества положительные контроли предпочтительно не должны быть теми же самыми, что и стандартные калибровочные материалы.

С.5.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.*22*, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В валидационном исследовании он использовался совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.*22* — Условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	59

С.5.8 Ограничения и интерпретация результатов

Так как разные линии ГМ-кукурузы, а не только кукуруза линии MON 810, могут содержать ту же самую специфическую для конструкции последовательность ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК кукурузы линии MON 810 в отсутствие ГМО, иных, чем кукуруза линии MON 810.

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

Совместное испытание лабораторий является значимым источником данных для обеспечения оценки погрешности. Также необходимо идентифицировать любые источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, такие как отбор проб и др., в соответствии с [*39*], [*40*].

С.5.9 Калибровка и расчет результатов

Исследователем должно быть определено пороговое значение для определения порогового цикла (C_t). Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве производителя к стандартным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 319-04981). См. также ссылку [*28*].

Конверсионный фактор (*Cf*) для количественного определения конструкции, специфической для линии MON 810, и референсной плазмиды, использовавшихся в совместном испытании лабораторий, равен 0,38. Расчет количества ГМ-кукурузы в матриксе образца *w*, %, проводят по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \frac{100}{Cf}, \qquad (C.3)$$

где N_{GM} — число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца;

N_{TX} — число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца.

Разделы С.6, С.7. Не включены (см. предисловие).

С.8 Метод количественного определения содержания ДНК кукурузы линии GA21 (специфический для конструкции) с использованием ПЦР в реальном времени

С.8.1 Введение

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

Примечание — *Cf* используется для расчета содержания ГМО (мас. %) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. *Cf* может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего стандартного материала.

Ограничения см. в С.8.8.

С.8.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.8.2.1 Общие положения

Этот метод был оптимизирован для приборов СДП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды pMul5 в качестве стандартного материала [*28*]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS), и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и T25.

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

Воспроизводимость и точность описанного метода была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием стандартных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержавших смеси зерен линии GA21 и обычной кукурузы [*29*].

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

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [*30*], [*31*], [*32*], [*33*].

С.8.2.2 Совместные испытания лабораторий

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержавших от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии GA21, были проанализированы 15 участниками.

Примечание — Для определения значений Cf и приготовления неизвестных образцов для совместного испытания лабораторий были использованы семена образца линии GA21, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [*29*], [*34*].

Валидация метода для кукурузы линии GA21 была проведена путем совместного испытания лабораторий в соответствии с протоколом AOAC [*34*]. Совместное испытание лабораторий было организовано Национальным Институтом исследования продуктов питания (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям, Саитама (Saitama), Япония и Национальным Институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences), Токио, Япония. 15 лабораторий, включая участников из Японии, Республики Корея и Соединенных Штатов Америки, проводили это совместное испытание с использованием СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Первая стадия имела своей целью определение Cf для GA21. Все участники получили набор праймеров, зондов, стандартный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии GA21, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit, и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции специфической для GA21 и таксон-специфической *zSSIIb* последовательности ДНК кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0,990$). В соответствии с протоколом AOAC [*34*] лаборатории, чьи данные были признаны «выбросами», должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0,025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0,025$). Ни одного выброса не наблюдалось ни в одном из тестов, как это показано в таблице С.*23*.

Таблица С.*23* — Сводные данные *Cf* для GA21

Целевая последовательность	Последовательность, специфическая для конструкции GA21
Число участвовавших лабораторий	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Число оставшихся лабораторий	15
Cf[a]	1,40 ± 0,05
[a] Выражено как среднее значение ± доверительный интервал ($\alpha = 0,05$).	

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

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

14 лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности, специфической для конструкции GA21. Лаборатории, которые не смогли определить пустые образцы с содержанием кукурузы линии GA21 0 %, были расценены как неработоспособные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми ($r > 0,990$). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями GA21, были исключены из испытания как выбросы по Кохрану и по Граббсу [*35*], [*36*], соответственно, еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В

полученных данных было обнаружено два выброса по Кохрану. Рассчитанное среднее значение содержания ГМО, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости (%) и относительное стандартное отклонение воспроизводимости (%) для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.*24* [*29*].

Примечание — Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения *Cf*, определенного в ходе первого совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значения *Cf* и проведении «слепых» анализов, было передано в NFRI и содержание ГМО в % в «слепых» испытательных образцах было преобразовано в окончательные результаты с использованием значений *Cf*.

Таблица С.*24* — Данные валидации для количественного определения последовательности, специфической для конструкции кукурузы GA21

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

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

С.8.2.3 Молекулярная специфичность

С.8.2.3.1 Общие положения

Этот метод был приведен в [*28*]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, доступна в ссылках [*28*] и [*41*]. Праймеры и зонды TaqMan® для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, описанной в [*41*].

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

С.8.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов была оценена путем поиска в базах данных DDBJ (3 декабря 1999 г.), и документация по оценке безопасности была опубликована Министерством здоровья, труда и благополучия (Япония) и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства (Япония) с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.8.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании с образцами высушенной кукурузной муки, содержавшей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии GA21, которые были приготовлены для этого метода NFRI [*28*], [*29*].

Испытанными образцами были зерна кукурузы, кукурузная крупа, кукурузная мука грубого и тонкого помола.

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

С.8.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов была проведена для СДП ABI PRISM 7700® с использованием набора TaqMan® химия [*38*].

Расчет праймеров и зондов был проведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.8.2.5 Предел детектирования (LOD)

Абсолютный предел детектирования в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOD, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,1 % кукурузы линии GA21.

С.8.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOQ, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,1 % кукурузы линии GA21.

С.8.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

С.8.4 Принцип

Фрагмент последовательности, специфической для конструкции кукурузы линии GA21, размером 133 п. о. амплифицировали с помощью ПЦР пары праймеров, специфических для GA21. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции GA21, меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся *набор* TaqMan® химия.

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

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного испытательного образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой праймер/зонд генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые составляли из пяти концентраций, включая 20, 125, 1500, 20000, 250000 копий ДНК плазмиды pMul5. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на ABI PRISM® 7700 SDS в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t, определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции GA21, соответственно, от логарифма числа копий ДНК плазмиды pMul5 [*28*], использовали для построения калибровочной кривой. Число копий, определенное для ДНК испытательного образца, получается путем интерполяции из стандартных кривых. Для определения количества GA21 в испытательном образце число копий конструкции GA21 делится на число копий гена *zSSIIb* и значение *Cf*, специфическое для конструкции GA21, умноженное на 100 для получения результата в процентах, как описано в разделе С.8.9.

С.8.5 Реактивы

С.8.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6).*

С.8.5.2 Вода.

С.8.5.3 TaqMan® Universal Master Mix, 2×.

С.8.5.4 Стандартный материал (плазмида).

Стандартным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5 [*28*], которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981) [*28*]. Могут быть использованы и другие стандартные материалы, если они могут продемонстрировать такие же или лучшие результаты.

С.8.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфических для конструкции линии GA21 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.25.

Таблица С.25 — Олигонуклеотиды

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

Длина ПЦР-продукта SSIIb составляет 151 п. о.; длина ПЦР-продукта GA21 составляет 133 п. о.

С.8.6 Прибор

С.8.6.1 Общие положения

Должен использоваться стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

С.8.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль исходно был оттестирован в ходе совместного испытания лабораторий с прибором СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.8.6.3 Реакционные плашка и микропробирки

Реакционные плашка и микропробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (восемь крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems), соответственно. Допускается использовать и другие реакционные плашки, микрофлаконы или микропробирки, если они могут продемонстрировать такие же или лучшие результаты.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

С.8.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

С.8.7.1 Общие положения

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

Метод описан для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 25 мкл с реактивами, приведенными в таблицах С.26 для *zSSIIb* и С.27 для GA21.

Таблица С. 26 — Реакционная смесь амплификации в окончательном объеме на одну реакционную пробирку для целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb*

Суммарный объем реакции		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК полимеразу и дНТФ)	TaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI)	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*1-5′ и *zSSIIb* 1-3′ (см. таблицу С.25)	См. таблицу С.25
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.25)	См. таблицу С.25

Таблица С.27 — Реакционная смесь амплификации для специфической последовательности GA21 в окончательном объеме в расчете на одну реакционную пробирку

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

С.8.7.2 Контроли ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все контроли, как это определено в *ГОСТ Р 53214.*

Если контроли не дадут ожидаемых результатов, результаты испытаний должны быть забракованы и анализ должен быть повторен.

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

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

b) плазмида, содержащая целевую(ые) последовательность(и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 310-04981) [*28*].

В соответствии с требованиями обеспечения качества положительные контроли предпочтительно не должны быть теми же самыми, что и стандартные калибровочные материалы.

С.8.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.*28*, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В валидационном исследовании он использовался совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависят от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.28 — Условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	95

С.8.8 Ограничения и интерпретация результатов

Так как разные линии ГМ-кукурузы, а не только кукуруза линии GA21, могут содержать ту же самую специфическую для конструкции последовательность ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК кукурузы линии GA21 в отсутствие ГМО, иных, чем кукуруза линии GA21.

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

Совместное испытание лабораторий является значимым источником данных для обеспечения оценки погрешности. Также необходимо идентифицировать любые источники погрешностей, которые не охватывают межлабораторные испытания, такие как отбор проб и др., в соответствии с основными международными договоренностями [*39*], [*40*].

С.8.9 Калибровка и расчет результатов

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

Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве производителя к стандартным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 319-04981). См. также [*28*].

Конверсионный фактор (*Cf*) для количественного определения конструкции, специфической для линии GA21, и референсной плазмиды, использовавшихся в совместном испытании лабораторий, равен 1,40.

Расчет количества ГМ-кукурузы, %, в матриксе образца, проводят по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \frac{100}{Cf}, \qquad (C.4)$$

где N_{GM} — число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца;

N_{TX} — число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца.

С.9 Метод количественного определения содержания ДНК кукурузы линии Т25 (специфический для конструкции) с использованием ПЦР в реальном времени

С.9.1 Введение

В этом приложении приведен метод обнаружения и количественного определения таксон-специфического гена кукурузы (ген синтазы крахмала кукурузы, IIb: *zSSIIb*) и специфического участка ДНК-конструкции — места соединения между последовательностью промотора вируса мозаики цветной капусты и синтетическим геном фосфинотрицинацетилтрансферазы (*pat*), происходящего из *Streptomyces viridochromogenes* и присутствующего в ГМ-кукурузе линии Т25, на основе ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды в качестве стандартного материала для определения относительного количества Т25 с применением конверсионного фактора (*Cf*), представляющего собой отношение числа копий специфических для конструкции и таксон-специфических последовательностей ДНК в репрезентативном образце семян истинной кукурузы линии Т25.

Примечание — *Cf* используется для расчета содержания ГМО (мас. %) из числа копий ДНК ГМО целевой и таксон-специфической последовательностей. *Cf* может быть измерен как отношение числа копий для целевой последовательности и таксон-специфической последовательности из соответствующего стандартного материала.

Ограничения см. в С.9.8.

С.9.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

С.9.2.1 Общие положения

Этот метод был оптимизирован для прибора СДП ABI PRISM® 7700 ПЦР в реальном времени с использованием плазмиды pMul5 в качестве стандартного материала [*28*]. Плазмида pMul5 включает, в частности, ПЦР-продукты, амплифицированные из систем ПЦР для специфической амплификации таксон-специфической последовательности из кукурузы (*zSSIIb*), последовательности 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (p35S), терминаторной последовательности нопалин-синтазы (tNOS), и последовательности, специфической для конструкций MON 810, Event176, Bt11, GA21 и Т25.

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

Воспроизводимость и точность описанного метода была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием стандартных материалов и неизвестных образцов высушенной муки семян кукурузы, содержавших смеси зерен линии Т25 и обычной кукурузы [*29*].

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

Метод был опубликован в японском и корейском национальных стандартах [*30*], [*31*], [*32*], [*33*].

С.9.2.2 Совместные испытания лабораторий

Всего 12 неизвестных образцов кукурузы, содержавших от 0 % до 10 % (по массе) высушенной кукурузной муки, полученной из кукурузы линии Т25, были проанализированы 15 участниками.

Примечание — Для определения величин *Cf* и приготовления неизвестных образцов для совместного испытания лабораторий были использованы семена образца линии Т25, гетерозиготной по ГМ-вставке. Для валидации были приготовлены неизвестные образцы смесей кукурузной муки, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) сухой кукурузной муки, полученной из этой линии. Гомогенность образцов на каждом уровне была протестирована с использованием количественного метода в соответствии с протоколом AOAC [*29*], [*34*].

Валидация метода для кукурузы линии Т25 была проведена путем совместного испытания лабораторий в соответствии с протоколом AOAC [*34*]. Совместное испытание лабораторий было организовано Национальным

Институтом исследования продуктов питания (NFRI, Tsukuba, Япония) совместно с Центром маркировки качества пищевых продуктов и услуг потребителям, Саитама (Saitama), Япония и Национальным Институтом здравоохранения (National Institute of Health Sciences), Токио, Япония. 15 лабораторий, включая участников из Японии, Республики Корея и Соединенных Штатов Америки, проводили это совместное испытание с использованием СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) в две отдельные стадии. От всех участников требовалось следовать процедурам экстракции ДНК и количественной ПЦР.

Первая стадия имела своей целью определение *Cf* для T25. Все участники получили набор праймеров, зондов, стандартный материал и ДНК, экстрагированную из семян кукурузы линии T25, которые были приготовлены из Qiagen DNeasy Plant Maxi kit и чья пригодность была протестирована NFRI перед исследованием. Эти образцы ДНК использовались для измерения числа копий конструкции, специфической для T25 и таксон-специфической *zSSIIb* последовательности ДНК кукурузы. Все измерения на этой стадии были повторены три раза. От участников было получено всего 90 комплектов данных. Корреляции калибровочных кривых, для которых были представлены данные от всех участников, были приемлемыми ($r > 0{,}990$). В соответствии с протоколом AOAC [*34*] лаборатории, чьи данные были признаны выбросами, должны быть удалены как имеющие экстремальные значения (тест Кохрана, $p < 0{,}025$) и как имеющие экстремальный средний уровень (тест Граббса, $p < 0{,}025$). Ни одного выброса не наблюдалось ни в одном из тестов, как это показано в таблице С.*29*.

Таблица С.*29* — Сводные данные *Cf* для T25

Целевая последовательность	Последовательность, специфическая для конструкции T25
Число участвовавших лабораторий	15
Число выбросов по тесту Кохрана	0
Число выбросов по тесту Граббса	0
Число оставшихся лабораторий	15
Cf[a]	0,34 ± 0,01
[a] Выражено как среднее значение ± доверительный интервал ($\alpha = 0{,}05$).	

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

На второй стадии были проведены «слепые» анализы. Неизвестные образцы кукурузной муки были приготовлены как шесть пар «слепых» дубликатов, которые содержали 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % и 10 % (по массе) высушенной муки ГМ-кукурузы линии T25 в смеси с обычной кукурузной мукой [*29*]. Образец, не содержавший кукурузы линии T25 (0 %), был использован как «пустой» образец, чтобы отсеять неработоспособные лаборатории перед статистическим анализом. Участники были проинструктированы экстрагировать ДНК из образцов с использованием набора Qiagen. Данные, представленные лабораториями, оставшимися в испытаниях после тестов на выбросы, были использованы для расчета среднего значения ГМО и доверительного интервала ($\alpha = 0{,}05$). Средние значения были определены как *Cf* для расчета количества ГМО (%) в ходе «слепого» анализа. Средняя величина *Cf* для количественного определения последовательности, специфической для конструкции T25, составляла 0,34.

14 лабораторий, участвовавших во второй стадии, проанализировали 168 образцов путем амплификации *zSSIIb* и последовательности, специфической для конструкции T25. Лаборатории, которые не смогли определить пустые образцы с содержанием кукурузы линии T25 0 %, были расценены как неработоспособные, и все их данные были исключены еще до тестов на выбросы. Во всех экспериментах корреляции калибровочных кривых были приемлемыми ($r > 0{,}990$). Лаборатории, показавшие экстремальные отклонения и экстремальные средние значения данных в парах «слепых» дубликатов с разными уровнями T25, были исключены из испытания как выбросы по Кохрану и выбросы по Граббсу [*35*], [*36*], соответственно, еще перед статистическим анализом достоверности и точности. В полученных данных было обнаружено два выброса по Кохрану. Рассчитанные средние значения содержания ГМО, отклонение, относительное стандартное отклонение повторяемости (%) и относительное стандартное отклонение воспроизводимости (%) для каждого уровня ГМО в смеси приведены в таблице С.*30*.

Примечание — Участники совместных испытаний не рассчитывали окончательные результаты с использованием значения *Cf*, определенного в ходе первого совместного испытания. Число копий для каждой целевой последовательности, полученное при определении значений *Cf* и проведении «слепых» анализов, было передано в NFRI и содержание ГМО (%) в «слепых» испытательных образцах было преобразовано в окончательные результаты с использованием значений *Cf*.

Таблица С.30 — Данные валидации для количественного определения последовательности, специфической для конструкции кукурузы Т25

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

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

С.9.2.3 Молекулярная специфичность

С.9.2.3.1 Общие положения

Этот метод был приведен в [*28*]. Информация о генетической конструкции, встроенной в геном кукурузы, доступна в ссылках [*28*] и [*41*]. Праймеры и зонды TaqMan® для разработки этого метода были сконструированы с помощью информации, описанной в [*41*].

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

С.9.2.3.2 Теоретическая специфичность

Теоретическая специфичность праймеров и зондов была оценена путем поиска в базах данных DDBJ (3 декабря 1999 г.), и документация по оценке безопасности была опубликована Министерством здоровья, труда и благополучия (Япония) и Министерством сельского хозяйства, лесного хозяйства и рыболовства (Япония) с использованием нуклеотидных последовательностей в качестве запросных последовательностей с помощью программы BLASTN 2.2.3. Результат поиска подтвержден полной идентичностью только с ожидаемой целевой последовательностью.

С.9.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Амплификация с праймерами и зондами, приводящая к получению ожидаемых ПЦР-продуктов при исследовании с образцами высушенной кукурузной муки, содержащей от 0 % до 10 % (по массе) ГМ-кукурузы линии Т25, которые были приготовлены для этого метода NFRI [*28*], [*29*].

Испытанными образцами были зерна кукурузы, кукурузная крупа, кукурузная мука грубого и тонкого помола.

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

С.9.2.4 Оптимизация

Оптимизация реактивов была проведена для СДП ABI PRISM 7700® с использованием набора TaqMan® химия [*38*].

Расчет праймеров и зондов был произведен с помощью программного обеспечения Primer Express® (Applied Biosystems).

С.9.2.5 Предел детектирования (LOD)

Абсолютный предел детектирования в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOD, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,5 % кукурузы линии Т25.

С.9.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOQ в соответствии с указаниями разработчика метода — 20 копий плазмид стандартного материала [*28*].

Относительный LOQ, валидированный в ходе совместного испытания лабораторий, — 0,5 % кукурузы линии Т25.

С.9.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

С.9.4 Принцип

Фрагмент последовательности, специфической для конструкции кукурузы линии Т25, размером 149 п. о. амплифицировали с помощью ПЦР пары праймеров, специфических для Т25. ПЦР-продукты измерялись в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью олигонуклеотидного зонда, специфического для конструкции Т25, меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя. Для этих целей применялся TaqMan® химия.

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

Для количественного определения числа копий в экстрагированной ДНК из экстрактов ДНК неизвестного испытательного образца был использован метод калибровочной кривой. Отдельные калибровочные кривые с каждой системой праймер/зонд генерировались в ходе одного и того же прогона аналитической амплификации. Калибровочные кривые составляли из пяти концентраций, включая 20, 125, 1500, 20000, 250000 копий ДНК плазмиды pMul5. В каждой из пяти калибровочных точек проводились трехкратные измерения. Тройные реакции с использованием соответствующих разбавлений ДНК, экстрагированной из неизвестного образца, проводились на ABI PRISM® 7700 SDS в том же самом аналитическом прогоне.

График зависимости значений C_t, определенных для калибровочных точек в специфической для *zSSIIb* или целевой последовательности конструкции Т25, соответственно, от логарифма числа копий ДНК плазмиды pMul5 использовали для построения калибровочной кривой. См. также ссылку [*28*]. Число копий, определенное для ДНК испытательного образца, получается путем интерполяции из стандартных кривых. Для определения количества Т25 в испытательном образце число копий конструкции Т25 делится на число копий гена *zSSIIb* и значение *Cf*, специфическое для конструкции Т25, умноженное на 100 для получения результата в процентах, как описано в разделе С.9.9.

С.9.5 Реактивы

С.9.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. *ГОСТ Р 53214 (подраздел 6.6)*.

С.9.5.2 Вода.

С.9.5.3 TaqMan® Universal Master Mix, 2×.

С.9.5.4 Стандартный материал (плазмида).

Стандартным материалом, использовавшимся для разработки и валидации метода, служила плазмида pMul5, которая включена в набор плазмид для обнаружения ГМ кукурузы (Fasmac № PM-2 и Nippon Gene № 319-04981) [*28*]. Могут быть использованы и другие стандартные материалы, если они могут продемонстрировать такие же или лучшие результаты.

С.9.5.5 Олигонуклеотиды

Последовательности праймеров и зондов для специфических для конструкции линии Т25 и таксон-специфических генов кукурузы приведены в таблице С.*31*.

Таблица С.*31* — Олигонуклеотиды

Наименование олигонуклеотида	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность таксон-специфического гена		
SSIIb 1-5′	5′-CTC CCA ATC CTT TgA CAT CTg C-3′	500 нмоль/дм^3
SSIIb 1-3′	5′-TCg ATT TCT CTC TTg gTg ACA gg-3′	500 нмоль/дм^3
SSIIb-Taq	5′-FAM-AgC AAA gTC AgA gCg CTg CAA TgC A-TAMRA-3′[a]	200 нмоль/дм^3
Целевая последовательность ГМО		
T25 1-5′	5′-gCC AgT TAg gCC AgT TAC CCA-3′	500 нмоль/дм^3
T25 1-3′	5′-TgA gCg AAA CCC TAT AAg AAC CCT-3′	500 нмоль/дм^3
T25-2-Taq	5′-FAM-TgC Agg CAT gCC CgC TgA AAT C-TAMRA-3′[a]	200 нмоль/дм^3
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин.		

Длина ПЦР-продукта SSIIb составляет 151 п. о.; длина ПЦР-продукта T25 составляет 149 п. о.

С.9.6 Прибор

С.9.6.1 Общие положения

Должен использоваться стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

С.9.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль исходно был оттестирован в ходе совместного испытания лабораторий с прибором СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы ПЦР в реальном времени после адаптации условий реакции.

С.9.6.3 Реакционные плашка и микропробирки

Реакционные плашка и микропробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (восемь крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems) соответственно. Допускается использовать и другие реакционные плашки, микрофлаконы или микропробирки, если они могут продемонстрировать такие же или лучшие результаты.

С.9.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

С.9.7.1 Общие положения

ПЦР для целевой последовательности таксон-специфического гена *zSSIIb* и для специфической целевой последовательности линии T25 должна проводиться в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод приведен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 25 мкл с реактивами, список которых приведен в таблицах С.*32* для *zSSIIb* и С.*33* для T25.

Таблица С.*32* — Реакционная смесь амплификации в окончательном объеме на одну реакционную пробирку для целевой таксон-специфической последовательности *zSSIIb*

Суммарный объем реакции		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК полимеразу и дНТФ)	TaqMan® Universal PCR Master Mix (ABI)	12,5 мкл
Праймеры	*zSSIIb*1-5′ и *zSSIIb* 1-3′ (см. таблицу С.*31*)	См. таблицу С.*31*
Зонд	*zSSIIb*-Taq (см. таблицу С.*31*)	См. таблицу С.*31*

Таблица С.*33* — Реакционная смесь амплификации для специфической последовательности Т25 в окончательном объеме в расчете на одну реакционную пробирку

Суммарный реакционный объем		25 мкл
Кодирующая нить ДНК (50 нг геномной ДНК кукурузы)		2,5 мкл
Реакционный буфер (включая ДНК-полимеразу и дНТФ)	Универсальная смесь для ПЦР Universal Master Mix (ABI) TaqMan®	12,5 мкл
Праймеры	Т25 1-5′ and Т25 1-3′ (см. таблицу С.*31*)	См. таблицу С.*31*
Зонд	Т25-2-Taq (см. таблицу С.*31*)	См. таблицу С.*31*

С.9.7.2 Контроли ПЦР

Каждая серия испытаний должна включать все контроли, как это определено в *ГОСТ Р 53214.*

Если контроли не дадут ожидаемых результатов, результаты испытаний должны быть забракованы, и анализ должен быть повторен.

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

a) высококачественная чистая геномная ДНК, экстрагированная из зерен кукурузы, может быть использована, если количество ДНК известно на основе расчета числа копий целевой последовательности, исходя из размера генома кукурузы линии Т25;

b) плазмида, содержащая целевую(ые) последовательность(и), может быть добавлена в различных концентрациях с известным числом копий. Такая плазмида доступна в наборе GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PS-2 и Nippon Gene No. 310-04981). См. также [*28*].

В соответствии с требованиями обеспечения качества положительные контроли предпочтительно не должны быть теми же самыми, что и стандартные калибровочные материалы.

С.9.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице С.*34*, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В валидационном исследовании он использовался совместно с универсальной смесью для ПЦР TaqMan® Universal Master Mix. Использование других термоциклеров может потребовать специальной адаптации. Время, необходимое для активации/инициации денатурации, зависит от особенностей используемой смеси Master Mix.

Таблица С.*34* — Условия реакции

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация		120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК		600	95
ПЦР (40 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	30	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	59

С.9.8 Ограничения и интерпретация результатов

Если ГМ-кукуруза, иная, чем кукуруза линии Т25, содержит ту же самую специфическую для конструкции последовательность ДНК, метод пригоден только для количественного определения ДНК кукурузы линии Т25 в отсутствие ГМО, иных, чем кукуруза линии Т25.

Описанный метод пригоден только для определения соотношения последовательности, специфической для конструкции линии Т25, и таксон-специфической *zSSIIb*-последовательности кукурузы. Это соотношение отражает количество Т25 в исследуемом образце кукурузы. Этот метод был валидирован только для зерен кукурузы.

Совместное испытание лабораторий является значимым источником данных для обеспечения оценки погрешности. Также необходимо идентифицировать любые источники погрешностей, которые не охватываются межлабораторными испытаниями, такие как отбор проб и др., в соответствии с основными международными договоренностями [*39*], [*40*].

С.9.9 Калибровка и расчет результатов

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

Пример процедуры после ПЦР-анализа можно найти в руководстве производителя к стандартным материалам ГМ-кукурузы (GM Maize Detection Plasmid Set (Fasmac No. PM-2 и Nippon Gene No. 319-04981). См. также [*28*].

Конверсионный фактор *(Cf)* для количественного определения конструкции, специфической для линии Т25, и референсной плазмиды, использовавшихся в совместном испытании лабораторий, равен 0,34. Расчет количества ГМ-кукурузы, %, в матриксе образца, проводят по формуле

$$w = \frac{N_{GM}}{N_{TX}} \frac{100}{Cf}, \qquad (C.5)$$

Где N_{GM} — число копий ГМ-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца;

N_{TX} — число копий таксон-специфической целевой последовательности ДНК испытательного образца.

Приложение D
(*рекомендуемое*)

Метод, специфический для трансформационного события

Раздел D.1. Не включен (см. предисловие).

D.2 Метод относительного количественного определения содержания ДНК кукурузы линии MON 810 (специфический для трансформационного события) с использованием ПЦР в реальном времени

D.2.1 Введение

В этом приложении приведен метод специфической амплификации и количественного определения специфического участка, состоящего из таксон-специфического гена (гена белка группы высокой мобильности [*hmg*] [*42*]) кукурузы (Zea mays) и единственной копии ДНК из района граничного соединения геномной последовательности и элемента встроенной последовательности, происходящего из вируса мозаики цветной капусты (35S-промотора CaMV), получившегося в результате рекомбинации *in vitro*, который присутствует в генетически модифицированной устойчивой к насекомым кукурузе MON 810 («YieldGuard», Monsanto), с целью оценки относительного количества ДНК кукурузы MON 810.

Ограничения см. в D.2.8.

D.2.2 Статус подтверждения достоверности и характеристики рабочих параметров

D.2.2.1 Общие положения

Метод был оптимизирован для сертифицированного стандартного материала (CCM IRMM-413) [*43*], состоящего из высушенной кукурузной муки, содержавшей смеси генетически модифицированной кукурузы MON 810 и обычной кукурузы.

Воспроизводимость и точность описанного метода была проверена в ходе совместных испытаний лабораторий с использованием серии CCM IRMM-413, упомянутых выше.

Число копий целевых генов в расчете на геном определено не было.

Метод был исходно разработан для СДП ABI PRISM® 7700.

D.2.2.2 Совместные испытания лабораторий

Метод был валидирован в ходе совместного испытания лабораторий Федеральным институтом оценки рисков (Federal Institute for Risk Assessment, BfR) в содружестве с Американской ассоциацией химиков зерна (American Association of Cereal Chemists, AACC), Совместным исследовательским центром (Joint Research Centre, JRC) Еврокомиссии (EC), Институтом стандартных материалов и измерений (Institute for Reference Material and Measurement, IRMM), Институтом здоровья и защиты потребителей (Institute for Health and Consumer Protection, IHCP) и фирмой GeneScan, Berlin. Совместное испытание было организовано таким образом, чтобы оно удовлетворяло критериям, изложенным в согласованном протоколе IUPAC [*15*]. Исследование было предпринято 15 лабораториями, использующими ABI PRISM® 7700, ABI PRISM® 7900 (Applied Biosystems) или iCycler iQ систему детектирования ПЦР в реальном времени (Bio-Rad Laboratories). 14 лабораторий сообщили результаты.

В соответствии с инструкциями производителя для экстракции ДНК была использована ДНК-экстракционная система GENE*Spin* (GeneScan).

Для каждого неизвестного образца была предпринята одна экстракция ДНК. Каждый испытательный образец был проанализирован с помощью ПЦР в трех повторностях.

Каждый участник получил 12 неизвестных образцов. Образцы состояли из шести сертифицированных стандартных материалов (CCM IRMM-413), содержавших от < 0,02 % до 5,0 % ГМ-кукурузы MON 810 (по массе) в смеси с обычной кукурузой.

Межлабораторные испытания были спланированы как двойные «слепые» испытания. Каждая лаборатория получила каждую из концентраций CCM ГМ-кукурузы MON 810 в двух неизвестных образцах.

Подробности совместного испытания лабораторий приведены в таблице D.*1*.

Таблица D.*1* — Данные валидации количественного определения специфического для трансформационного события MON 810 за 2003/2004 годы

Наименование показателя	Образец 1 < 0,02 %	Образец 2 0,10 ± 0,03 %	Образец 3 0,50 % ± 0,04 %	Образец 4 1,00 ± 0,05 %	Образец 5 2,0 ± 0,1 %	Образец 6 5 %
Число лабораторий, приславших результаты	11	14	14	14	14	14
Число исключенных лабораторий[a]	1	1	0	2	0	0

Окончание таблицы D.1

Наименование показателя	Образец 1 < 0,02 %	Образец 2 0,10 ± 0,03 %	Образец 3 0,50 % ± 0,04 %	Образец 4 1,00 ± 0,05 %	Образец 5 2,0 ± 0,1 %	Образец 6 5 %
Число лабораторий, оставшихся после исключения	10	13	14	12	14	14
Среднее значение, %	0,028	0,1023	0,4613	0,8327	1,7814	4,5154
Стандартное отклонение повторяемости s_R	0,00736	0,03641	0,9606	0,13744	0,28385	1,29374
Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	26,27	35,60	20,82	16,51	15,93	28,65
Предел повторяемости r ($r = 2,8\ s_r$)	0,0206	0,1019	0,269	0,3848	0,7948	3,6225
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R	0,02326	0,04646	0,20068	0,26534	0,56609	1,65451
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости, %	83,03	45,43	43,5	31,86	31,78	36,64
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$)	0,0651	0,1301	0,5619	0,743	1,5851	4,6326
[a] Выбросы идентифицировали с помощью тестов Кохрана и Граббса.						

D.2.2.3 Молекулярная специфичность

D.2.2.3.1 Общие положения

Наборы праймеров были разработаны для амплификации последовательности ДНК, специфической для искусственного соединения (района граничного соединения) между интегрированной генетической конструкцией и хозяйским геномом, которая в природе не встречается.

D.2.2.3.2 Теоретическая специфичность

Никакой гомологии последовательностей с последовательностями не модифицированной генетически кукурузы и других сельскохозяйственных растений не было обнаружено путем поиска в базах данных (база данных GenBank®; BlastN® 2.2.1, поиск от 1 октября 2003 г.). Результат поиска с помощью программы BLASTN на сайте *Национального института здравоохранения США* [14 сентября 2004 г.] дал 100 %-ное совпадение с последовательностью с номером доступа AF434709, описывающей специфический для MON 810 участок интеграции в кукурузном геноме.

D.2.2.3.3 Экспериментальное определение специфичности

Идентифицировали ССМ IRMM-413 высушенной кукурузной муки, содержавшей от < 0,02 % до 5,0 % генетически модифицированной кукурузы линии MON 810.

Тесты на специфичность, проведенные перед исследованием, показали отсутствие перекрестной реактивности систем детектирования к следующим нецелевым видам/образцам: ДНК сои.

Не обнаружено перекрестной реактивности со следующими трансформационными событиями ГМ-кукурузы: Event176, Bt11, T25, GA21 и сои GTS 40-3-2.

D.2.2.4 Оптимизация

Оптимизация концентраций реактивов была произведена для СДП ABI PRISM® 7700 и СДП GenAmp 5700 с использованием набора TaqMan® химия.

Расчет праймеров и зондов был произведен с помощью программного обеспечения Primer Express® software (Applied Biosystems).

D.2.2.5 Предел детектирования (LOD)

Абсолютный предел детектирования не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода абсолютный LOD, как это определено в *ГОСТ Р 53214*, составляет 5 копий целевой последовательности.

Относительный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода относительный LOD, как это определено в *ГОСТ Р 53214*, составляет по крайней мере 0,1 %.

D.2.2.6 Предел количественного определения (LOQ)

Абсолютный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что абсолютный предел количественного определения составляет 10 копий целевой последовательности.

Относительный LOD не был определен в ходе межлабораторных испытаний. В соответствии с указаниями разработчика метода было показано, что относительный предел количественного определения составляет по крайней мере 0,1 % (равен точке наименьшей концентрации на использовавшейся калибровочной кривой).

D.2.3 Адаптация

Специфическая информация отсутствует.

D.2.4 Принцип

Фрагмент размером 92 п. о. последовательности, специфической для кукурузы линии MON 810, был амплифицирован с помощью ПЦР. Накопленные ПЦР-продукты измеряли в ходе каждого цикла ПЦР (в реальном времени) с помощью специфического для целевой последовательности олигонуклеотидного зонда, меченного двумя флуоресцентными красителями — FAM в качестве репортерного красителя и TAMRA в качестве гасителя [*33*].

Для относительной количественной оценки содержания ДНК кукурузы линии MON 810 с помощью специфической для кукурузы референсной системы амплифицировали фрагмент размером 79 п. о. кукурузного гена *hmg*, используя ген-специфическую комбинацию праймеров и зондов.

D.2.5 Реактивы

D.2.5.1 Общие положения

Для получения информации о качестве реактивов, которые могут использоваться, см. *ГОСТ Р 53214, подраздел 6.6).*

D.2.5.2 Вода.

D.2.5.3 ПЦР-буфер (без $MgCl_2$), 2×.

D.2.5.4 Раствор $MgCl_2$, $c(MgCl_2)$ = 25 ммоль/дм^3.

D.2.5.5 Раствор дНТФ, c(дНТФ) = 2,5 ммоль/ дм^3 (каждый).

D.2.5.6 Олигонуклеотиды

Характеристики применяемых олигонуклеотидов приведены в таблице D.2.

Таблица D.2 — Олигонуклеотиды

Наименование показателя	ДНК-последовательность олигонуклеотида	Окончательная концентрация при ПЦР
Целевая последовательность референсного гена		
ZM1-F	5′-TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA-3′	300 нмоль/дм^3
ZM1-R	5′-gCT ACA TAg ggA gCC TTg TCC T-3′	300 нмоль/дм^3
Зонд ZM1	5′-FAM-CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-TAMRA-3′[a]	160 нмоль/дм^3
Целевая последовательность ГМО		
Mail-F1	5′-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA CgT-3′	300 нмоль/дм^3
Mail-R1	5′-gCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3′	300 нмоль/дм^3
Зонд Mail-S2	5′-FAM-AAC ATC CTT TgC CAT TgC CCA gC-TAMRA P-3′[a]	180 нмоль/дм^3
[a] FAM: 6-карбоксифлуоресцеин; TAMRA: 6-карбокситетраметилродамин. Длина ампликона кукурузы Bt11 составляет 70 п. о.		

Длина ген-специфического ПЦР-продукта *hmg*-гена составляет 79 п. о.; длина MON 810-специфического ПЦР-продукта составляет 92 п. о.

D.2.5.7 Термостабильная ДНК-полимераза

ДНК-полимераза AmpliTaq Gold®.

D.2.5.8 Урацил-N-гликозилаза (необязательно)

D.2.5.9 Реакционная смесь амплификации

Подробности реакционной смеси амплификации приведены в таблице D.3.

D.2.6 Прибор

D.2.6.1 Общие положения

Должен использоваться стандартный лабораторный прибор, если не определено иначе.

D.2.6.2 Термоциклер

Отмеченный температурно-временной профиль изначально был оттестирован с приборами СДП ABI PRISM® 7700 и СДП GeneAmp® 5700 (Applied Biosystems). Допускается использовать другие системы детектирования ПЦР в реальном времени после адаптации реакционных условий.

D.2.6.3 Реакционные пробирки

Реакционные пробирки должны быть подходящими для ПЦР-амплификации в термоциклере реального времени, например, ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate или MicroAmp® Optical Caps (восемь крышек/полоска, плоская) (Applied Biosystems).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования и реактивов с техническими характеристиками не ниже вышеуказанных, если может быть показано, что их применение приводит к тем же результатам.

D.2.7 Процедура: порядок проведения ПЦР

D.2.7.1 Общие положения

Порядок проведения ПЦР для такон-специфической целевой последовательности и для целевой последовательности ГМО проводят в отдельных пробирках. Мультиплексная ПЦР (с использованием различных флуоресцентных меток для зондов) не была протестирована или валидирована.

Метод приведен для суммарного объема реакционной смеси ПЦР 25 мкл с реактивами, список которых приведен в таблице D.*3*.

Таблица D.*3* — Реакционная смесь амплификации в окончательном объеме на одну реакционную пробирку

Суммарный объем реакции		25 мкл
Добавленная кодирующая нить ДНК (2,3 нг к 150 нг ДНК кукурузы)		5 мкл
ДНК-полимераза	AmpliTaq Gold®	1,25 ед.
Деконтаминационная система	дУТФ Урацил-*N*-гликозилаза AmpErase®	400 мкмоль/дм^3 0,5 ед.
Реакционный буфер	Буфер А TaqMan® (содержащий пассивный стандартный ROX)[a]	1×
$MgCl_2$		6,5 ммоль/дм^3
Праймеры	См. таблицу D.*2*	См. таблицу D.*2*
дНТФ	дАТФ, дЦТФ, дГТФ	200 мкмоль/дм^3 каждого
Зонды	См. таблицу D.*2*	См. таблицу D.*2*
[a] ROX — карбокси-Х-родамин.		

D.2.7.2 Контроли ПЦР

В качестве положительного контроля и стандартного калибровочного материала может быть использован сертифицированный стандартный материал MON 810 (материал, содержащий от < 0,02 % до 5 % генетически модифицированной кукурузы), изготовленной IRMM, Geel, Belgium (серии IRMM-413).

Следует использовать все соответствующие контроли, как это определено в *ГОСТ Р 53214*.

D.2.7.3 Температурно-временная программа

Температурно-временная программа, приведенная в таблице D.*4*, была оптимизирована для СДП ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems). В валидационном исследовании она была использована в сочетании с ДНК-полимеразой AmpliTaq Gold®. Использование других термоциклеров может потребовать специфической адаптации. Время для активации/первоначальной денатурации зависит от используемой полимеразы.

Условия реакции приведены в таблице D.*4*.

Таблица D.*4* — Процедура: условия реакции

Этапы определения	Время, с	Температура, °С
Пред-ПЦР: деконтаминация	120	50
Пред-ПЦР: активация ДНК-полимеразы и денатурация кодирующей нити ДНК	600	95

Окончание таблицы D.4

Этапы определения		Время, с	Температура, °С
ПЦР (45 циклов)			
Стадия 1	Денатурация	15	95
Стадия 2	Отжиг и элонгация	60	60

D.2.8 Ограничения и интерпретация результатов

Приведенный метод пригоден для измерения соотношения уровня MON 810-специфической ДНК к содержанию ДНК кукурузы. Это соотношение отражает относительное количество MON 810 в кукурузном ингредиенте исследуемого пищевого продукта.

Примечание — Если кукурузная ДНК удалена или сильно деградирована в ходе приготовления пищевого продукта (например, рафинированного растительного масла) или если кукуруза является лишь очень минорным компонентом в анализируемом образце, количество кукурузных референсных и/или ГМ-специфических копий будет на уровне или ниже предела количественного определения, и описанные методы не будут применимы.

D.2.9 Калибровка и расчет результатов

После определения порогового значения во время логарифмической фазы амплификации [например, от 0,01 до 0,1 нормализованной флуоресценции репортерного красителя (R_n)] программное обеспечение прибора рассчитывает значения C_t для каждой реакции. Строят график зависимости значений C_t, которые измерены для калибровочных точек, приготовленных из ССМ, предназначенных для количественных анализов (ССМ IRMM-413) в ПЦР-системах, специфических для кукурузного таксона и MON 810, соответственно, от натурального логарифма числа копий ДНК. Числа копий, измеренные для ДНК неизвестных образцов, получают интерполяцией из стандартных кривых.

Калибровочную кривую получают путем построения графика зависимости значений C_t от логарифма числа копий целевой последовательности для калибровочных точек. Это может быть сделано, например, с помощью программного обеспечения (электронной таблицы), такой как Microsoft Excel, или напрямую с использованием опций, доступных в программном обеспечении системы детектирования последовательностей.

Для определения количества ДНК MON 810 в испытательном образце число копий MON 810 делится на число эквивалентов кукурузного генома и умножается на 100, чтобы получить значение в процентах. Для получения величины 1С см. [*17*].

В дополнение к прогону количественного анализа следует проводить факультативный, так называемый контрольный прогон. Контрольный прогон должен быть также включен в межлабораторные испытания и он должен еще улучшить процедуру анализа. Контрольный прогон наиболее важен при анализе матриксов, для которых малоизвестны выход и качество ДНК. Тестируя в контрольном прогоне два различных разбавления экстрагированной нуклеиновой кислоты (например, разбавлений раствора ДНК 1:10 и 1:40), может быть обнаружено возможное присутствие ингибитора(ов) амплификации, а также может быть определено подходящее разбавление экстракта нуклеиновой кислоты, полученной из испытательного образца, попадающее в калибровочный диапазон количественного анализа.

Приложение Е
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам Российской Федерации, использованным в настоящем стандарте в качестве нормативных ссылок

Таблица Е.1

Обозначение ссылочного Национального стандарта Российской Федерации	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта и условное обозначение степени его соответствия ссылочному национальному стандарту
ГОСТ Р 5725-1—2002	ИСО 5725.1:1994 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения» (MOD)
ГОСТ Р 5725-6—2002	ИСО 5725.1:1994 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Использование значений точности на практике» (MOD)
ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006	ИСО 17025:2005 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» (IDT)
ГОСТ Р 50779.11—2000	ИСО 3534.2—93 «Статистические методы. Статистическое управление качеством. Термины и определения» (MOD)
ГОСТ Р 52173—2003	—
ГОСТ Р 52174—2003	—
ГОСТ Р 53214—2008	ИСО 24276:2006 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения» (MOD)

Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:
- IDT — идентичные стандарты;
- MOD — модифицированные стандарты.

Библиография

[1] *ИСО 21569:2005** *Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на качественном определении нуклеиновых кислот*

(ISO 21569:2005) *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods*

[2] *ИСО 21571:2005** *Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот*

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

[3] DIVIACCO, S., NORIO, P., ZENTILIN, L., MENZO, S., CLEMENTI, M., BIAMONTI, G., RIVA, S., FALASCHI, A. and GIACCA, M. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene*, 1992, 122 (2), 313-320

[4] PANNETIER, C., DELASSUS, S., DARCHE, S., SAUCIER, C. and KOURILSKY, P. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21 (3), 577-583

[5] ORLANDO, C., PINZANI, P. and PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.*,1998, 36 (5), 255-269

[6] YANG, B., YOLKEN, R. and VISCIDI, R. Quantitative polymerase chain reaction by monitoring enzymatic activity of DNA polymerase. *Anal. Biochem.*, 1993, 208 (1): 110-116

[7] THOMPSON, M. and WOOD, R. Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories, *J. Pure App. Chem.*, 1995, 67 (4), 649-666

[8] Alinorm 03/23 *Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes*. Codex Alimentarius Twenty-sixth Session, Rome, Italy, 30 June — 5 July 2003
gost.e-ecolog.ru ISBN 0-948926-12-0

[9] Eurachem Guide: «*The fitness for Purpose of Analytical methods — A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*», Eurachem Working Group, Dec. 1998

[10] Eurachem/CITAG Guide: *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Ellisson, S.L.R., Rosslein, M., Williams, A., 2000, 2nd Ed.
ISO Guide 32 Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials

[11] *IRMM Certified Reference Material Reports and Certificates*

[12] HERNANDEZ, M., DUPLAN, M.-N., BERTHIER, G., VAÏTILINGOM, M., HAUSER, W., FREYER, R., PLA, M. and BERTHEAU, Y. Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 2004, 52: 4632-4637

[13] HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Appl. Chem*, 1995, 67: 331-343

[14] DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep*. Vol. 1, 1983, 4:19-2156

[15] ARUMUGUNATHAN, K., EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1991, 9: 208-218

[16] Community Reference Laboratory (2004a). *GMO specific real-time PCR system*. Protocol for eventspecific quantitation of Bt11 in maize. Protocol published by the European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. gost.e-ecolog.ru . 6 pp.

[17] Community Reference Laboratory (2004b). *Validation of the GMO specific detection method developed by NVI/INRA for Bt11 in sweet maize*. Report published by the European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. gost.e-ecolog.ru %20Sweet%20maize%20validation%20report.pdf. 9 pp.

[18] JAENICKE-DESPRÉS, V., BUCKLER, E.S., SMITH, B.D., GILBERT, M.T.P., COOPER, A., DOEBLEY, J. and PÄÄBO, S. Early Allelic Selection in Maize as Revealed by Ancient DNA. *Science,* 2003, 302: 1206-1208

[19] PAUWELS, J., KRAMER, G.N., SCHIMMEL, H., ANKLAM, E., LIPP, M. BRODMANN, P. *The Certification of Reference Materials of Soya bean Powder with different Mass Fractions of RoundupReady® Soya bean*, EC certification report EUR 18683 EN, 1999, ISBN 92-828-5925-8

[20] PAULI, U., LINIGER, M., SCHROTT, M., SCHOUWEY, B., HÜBNER, Ph., BRODMANN, P. and EUGSTER, A Quantitative Detection of Genetically Modified Soybean and Maize: Method Evaluation in a Swiss Ring Trial. *Mitt. Lebens. und Hyg.* 2001, 92: 145-158

---

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

[21] HÜBNER, Ph., WAIBLINGER, H-U., PIETSCH, K. and BRODMANN, P. Validation of PCR Methods for Quantitation of Genetically Modified Plants in Food. *J. AOAC Int*, 2001, 84: 1855-1864

[22] VODKIN, L.O., RHODES, P.R., GOLDBERG, R.B. Ca Lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*,1983, 34: 1023-1031

[23] PADGETTE, S.R., KOLACZ, K.H., DELANNY, X., RE, D.B., LAVELLEE, B.J., TINIUS, C.N., RHODES, W.K., OTERO, Y.I., BARY, G.F., EICHHOLTZ, D.A., PESCHKE, V.M., NIDA, D.L., TAYLOR, N.B., KISHORE, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 1995, 35: 1451-1461

[24] SLMB-Methode 52B/2.1.3/2000 (CD-Rom, Eidgenössische Materialzentrale, PO Box, CH 3000, Bern)

[25] GRUBBS, F.E. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 1969, 11:1-21

[26] KURIBARA, H., SHINDO, Y., MATSUOKA, T., TAKUBO, K., FUTO, S., AOKI, M., HIRAO, T., AKIYAMA, H., GODA, Y., TOYODA, M. and HINO, A. Novel Reference Molecules for Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean. *J.AOAC Int.* 2002, 85, 1077-1089

[27] SHINDO, Y., KURIBARA, H., MATSUOKA, T., FUTO, S., SAWADA, C., SHONO, J., AKIYAMA, H., GODA, Y., TOYODA, M. and HINO, A. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. *J.AOAC Int.* 2002, 85, 1119-1126

[28] *Instruction Manual for Testing and Analysing Genetically Modified Food —Quantitative PCR*, Japanese Agricultural Standard Testing and Analysis Handbook Series (Centre for Food Quality, Labelling and Consumers Services, Saitama, Japan). 2002

[29] *Testing for Foods Produced by Recombinant DNA Techniques,* Ministry of Health, Labor and Welfare (Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan), 2002

[30] *Guideline of Detection Methods of Genetically Modified Foods,* Korean Food and Drug Administration, Korea

[31] *Testing Manual for Genetically Modified Agricultural Products* by National Agricultural Quality Services, Korea

[32] *European Food Res. Technol Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL,* 17th Ed., 2000, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Appendix D, pp 2—11

[33] COCHRAN, W.G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. *Annals of Eugenics,* 1949, 11: 47-52

[34] GRUBBS, F.E. Sample criteria for testing outlying observations. *Ann. Math. Statist. Assn.* 1950, 21: 27-58

[35] KOPPEL, E., STADLER, M., LUTHY, J., HUBNER, P. Sensitive method for the Detection of the Genetically Engineered Soy Bean «Roundup Ready®, *Mitt. Gebiete. Hyg*. 1997, 88: 164-175

[36] Anonymous. *Relative quantitation of Gene Expression*. User Bulletin ABI Prism 7700 Sequence Detection System, 1997, 2:1-36

[37] Eurachem Guide: «*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*», Ellisson, L.R., Rosslein, M., Williams, A., 2000

[38] Eurachem/CITAG Guide: *Traceability in Chemical Measurement*, Ellisson, L.R., King, B., Rosslein, M., Salit, M., Williams, A., 2003

[39] MATSUOKA, T., KURIBARA, H., TAKUBO, K., AKIYAMA, H., MIURA, H., GODA, Y., KUSAKABE, Y., ISSHIKI, K., TOYODA, M., & HINO, A. Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically modified Maize (Zea mays). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2100-2109

[40] KRECH, A.B., WURZ, A, STEMMER, C., FEIX, G., GRASSER, K.D. Structure of genes encoding chromosomal HMG1proteins from maize. *Gene,* 1999, 234: 45-50

[41] Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM): Certified Reference Materials ERM-XY000xy. CERTIFICATION REPORT. The certification of dry-mixed maize powder with different mass fractions of MON 810 maize Certified Reference Materials ERM BF413a, BF413b, BF413c, BF413d, BF413e, BF413f. gost.e-ecolog.ru , 2004

УДК 579.672:637.065:006.354	ОКС 65.120 67.040	Н09	ОКСТУ 9109 9209 9709

Ключевые слова: пищевые продукты, корма для животных, семена, растительные образцы, отобранные из окружающей среды, количественное определение содержания ДНК из ГМО, полимеразная цепная реакция в реальном времени, таксон-специфическая последовательность ДНК, целевая последовательность ДНК

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 16.06.2009. Подписано в печать 19.10.2009. Формат 60x84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 7,44. Уч.-изд. л. 6,80. Тираж 403 экз. Зак. 727.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6

gost.e-ecolog.ru