ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ISO 24276:2006
Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions
(MOD)

Издание официальное

БЗ 8—2008/208

Москва
Стандартинформ
2009

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. № 708-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 24276:2006 «Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения» (ISO 24276:2006 «Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions»).

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

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 . . . 1
4 Применение к подходящим международным стандартам . . . 6
4.1 Общие положения . . . 6
4.2 Руководство для пользователей по выбору методов . . . 7
4.3 Рабочие характеристики . . . 7
5 Общие требования к лаборатории и процедурам . . . 8
6 Интерпретация и представление результатов . . . 11
7 Протокол испытаний . . . 12
Библиография . . . 13

Введение

Цель такого анализа состоит в идентификации и количественной оценке содержания генетических элементов или белков обычных для генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов в *анализируемой пробе*.

Главным предметом настоящего стандарта являются методологии, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако поскольку технологические изменения в этой области происходят очень быстро, в будущем могут быть рассмотрены также и другие технологии.

Поиск ингредиентов генетически модифицированного происхождения осуществляется посредством следующих последовательных (или одновременных) стадий. После отбора *проб* из *анализируемой* пробы экстрагируются нуклеиновые кислоты или белки. Экстрагированный материал может далее очищаться в процессе экстракции или после нее. Затем проводится его количественное определение (при необходимости), разбавляется (при необходимости) и подвергается аналитическим процедурам, таким как ПЦР, или определению с помощью твердофазного иммуносорбентного анализа (ELISA). Эти стадии подробно изложены в настоящем стандарте и в следующих 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 21570 Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот [2];

ИСО 21571 Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот [3];

ИСО 21572 Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на определении белков [4].

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Продукты пищевые

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

Общие требования и определения

Foodstuffs. Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products. General requirements and definitions

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт содержит общие термины и определения, требования и руководящие указания для организации лабораторий, требования к методу подтверждения достоверности, описание методов и протоколов испытаний.

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

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 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

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

ГОСТ Р 50779.10—2000 (ИСО 3534-1—93) Статистические методы. Вероятность и основы статистики. 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

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 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 ИСО 5725-1*, *ГОСТ Р 50779.10* и [5], а также следующие термины с соответствующими определениями:

Издание официальное

3.1 Общие определения

3.1.1 **таксон-мишень (целевой таксон):** Таксон, к которому принадлежит генетически модифицированный организм.

Примечание — В настоящем стандарте таксон обычно означает биологический вид, однако он может иметь как более низкий, так и более высокий таксономический ранг.

3.1.2 ***лабораторная проба*:** *Проба*, подготовленная для отправки в лабораторию и предназначенная для анализа или тестирования.

3.1.3 ***проба для анализа* (*анализируемая проба*):** *Проба*, подготовленная для анализа, все количество которой будет использовано для экстракции анализируемого компонента за один раз.

3.1.4 **специфичность:** Свойство метода исключительным образом отвечать на *анализируемый* параметр или вещество.

3.1.5 **чувствительность:** Изменение ответной реакции, деленное на соответствующее изменение концентрации стандартной (калибровочной) кривой.

Примечание — Это наклон аналитической калибровочной кривой.

3.1.6 **предел детектирования (LOD):** Минимальное количество или концентрация анализируемого вещества в *анализируемой пробе*, которое может быть достоверно обнаружено, но необязательно оценено количественно, что может быть продемонстрировано с помощью совместных испытаний лабораторий или другого подходящего метода валидации.

Примечание — Совместные испытания лабораторий — в соответствии с [6], метод валидации — в соответствии с [7].

3.1.7 **предел количественного определения (LOQ) (в аналитических определениях):** Наименьшая концентрация или количество анализируемого вещества в *анализируемой пробе*, которая может быть количественно определена с приемлемым уровнем точности и достоверности, что может быть продемонстрировано с помощью совместных испытаний лабораторий или другого подходящего метода валидации.

Примечание — См. ссылку [6], описывающую совместные испытания лабораторий, и ссылку [7], описывающую метод валидации.

3.1.8 **точность:** Степень близости между результатом испытания и принятым стандартным значением.

3.1.9 **истинность:** Степень близости между средней величиной, полученной в результате большого числа испытаний, и принятым стандартным значением.

Примечание — Мера истинности обычно выражается в терминах отклонений (ошибок). Истинность может быть определена как «точность среднего».

3.1.10 **прецизионность:** Степень близости между независимыми результатами испытаний, полученными при заданных условиях.

Примечания

1 Прецизионность зависит только от распределения случайных ошибок и не связана с истинным значением или установленной величиной.

2 Мера прецизионности обычно выражается в терминах погрешности и рассчитывается как стандартное отклонение результатов испытаний. Меньшей прецизионности соответствует большее стандартное отклонение.

3 «Независимые результаты испытаний» означают результаты, полученные таким способом, который не подвергается влиянию полученных ранее результатов на тех же или аналогичных объектах испытаний. Количественные изменения прецизионности критически зависят от установленных условий. Условия повторяемости и воспроизводимости являются частными случаями экстремальных условий.

3.1.11 **повторяемость:** Прецизионность в условиях повторяемости.

3.1.12 **воспроизводимость:** Прецизионность в условиях воспроизводимости.

3.1.13 **условия повторяемости:** Условия, при которых независимые результаты испытаний получаются в течение короткого интервала времени одним и тем же методом на идентичных *анализируемых пробах* в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование.

3.1.14 **условия воспроизводимости:** Условия, при которых результаты испытаний получаются одним и тем же методом на идентичных *анализируемых пробах* в разных лабораториях разными операторами, использующими разное оборудование.

Примечание — Когда разные методы дают результаты испытаний, различающиеся незначительно, или когда разные методы разрешены планом эксперимента, термин «воспроизводимость» может быть применен к итоговым параметрам. Условия должны быть ясно определены.

3.1.15 **стандартное отклонение повторяемости:** Стандартное отклонение результатов испытаний, полученных в условиях повторяемости.

Примечание — Стандартное отклонение повторяемости представляет собой меру дисперсии распределения результатов испытаний в условиях повторяемости. Аналогично «отклонение повторяемости» и «коэффициент вариации повторяемости» могут быть определены и использованы в качестве меры дисперсии результатов испытаний в условиях повторяемости.

3.1.16 **стандартное отклонение воспроизводимости:** Стандартное отклонение результатов испытаний, полученных в условиях воспроизводимости.

Примечание — Стандартное отклонение повторяемости представляет собой меру дисперсии распределения результатов испытаний в условиях воспроизводимости. Аналогично «отклонение воспроизводимости» и «коэффициент вариации воспроизводимости» могут быть определены и использованы в качестве меры дисперсии результатов испытаний в условиях воспроизводимости.

3.1.17 **предел повторяемости:** Величина, меньшая или равная абсолютной разнице между двумя результатами испытаний, полученными в условиях повторяемости, ожидаемая с вероятностью 95 %.

Примечания

1 Используется обозначение *r*.

2 При рассмотрении двух единичных результатов испытаний, полученных в условиях повторяемости, сравнение следует производить с пределом повторяемости $r = 2{,}8\ sr$.

3.1.18 **предел воспроизводимости:** Величина, меньшая или равная абсолютной разнице между двумя результатами испытаний, полученных в условиях воспроизводимости, ожидаемая с вероятностью 95 %.

Примечания

1 Используется обозначение *R*.

2 При рассмотрении двух единичных результатов испытаний, полученных в условиях воспроизводимости, сравнение должно производиться с пределом воспроизводимости $R = 2{,}8\ sR$.

3.1.19 **совместные межлабораторные испытания:** Испытания, в которых несколько лабораторий обнаруживают и/или определяют какой-либо компонент в одной или нескольких «идентичных» порциях гомогенных стабильных материалов при условиях документирования.

Примечание — Руководящие указания по проведению совместных испытаний детально разработаны в гармонизированном протоколе *ГОСТ Р ИСО 5725-2*.

3.1.20 **соответствие цели (применимость):** Область применения метода, которая определяет матрикс, компонент или биологический вид, которые будут исследоваться, диапазон концентраций и тип исследования/контрольного испытания, которому процедура, как можно судить из ее рабочих характеристик, соответствует.

Примечание — Она также описывает известные ограничения метода [*7*].

3.1.21 **осуществимость:** Легкость эксплуатации, в терминах пропускной способности и стоимости *проб* для достижения необходимых критериев рабочих параметров и достижения таким образом поставленной цели.

3.1.22 **диапазон применимости (диапазон количественной оценки/линейность/динамический диапазон):** Количественный интервал, внутри которого, как показано совместными испытаниями или другой подходящей процедурой валидации, аналитическая процедура имеет достаточный уровень точности и прецизионности.

Примечание — См. ссылку. Совместные испытания — в соответствии с [*6*], метод валидации — в соответствии с [*7*].

3.1.23 **погрешность измерения:** Параметр, связанный с результатом измерения, который характеризует дисперсию величин, которые обоснованно могут быть приписаны компоненту.

3.1.24 **метод скрининга:** Метод, который позволит быстро и достоверно исключить (отсеять) большое число отрицательных (или положительных) *анализируемых проб* и ограничить число *анализируемых проб*, требующихся для применения точного метода.

Примечания

1 См. ссылку [8].

2 В настоящем стандарте метод скрининга представляет собой метод обнаружения генных продуктов (таких как белки) и/или генетических элементов, общих для нескольких ГМО (таких как промоторы, терминаторы или другие интересующие генетические элементы).

3.1.25 ***метод, специфичный для определения генетической конструкции:***

Метод, однозначно позволяющий определить конкретную генетическую конструкцию, которая может быть обнаружена только в материале, полученном из ГМО.

3.1.26 **метод, *специфичный для трансформационного события*:**

Метод, позволяющий обнаружить уникальную специфическую последовательность, которая присутствует только в том или ином конкретном трансформационном событии.

Примечание — Он обычно направлен на граничную область интеграции.

3.2 Термины, относящиеся к экстракции и очистке ДНК

3.2.1 **Экстракция ДНК:** Отделение ДНК от других компонентов *анализируемой пробы.*

3.2.2 **Очистка ДНК:** Метод, приводящий к получению более чистой ДНК.

Примечание — В этом контексте чистота относится к уменьшению наблюдаемых и измеряемых эффектов ингибиторов ПЦР.

3.2.3 **ДНК ПЦР-качества:** ДНК в *анализируемой пробе* достаточной длины, химической чистоты и структурной целостности, пригодная для амплификации методом ПЦР.

3.3 Термины, относящиеся к амплификации ДНК и ПЦР

3.3.1 **идентификация последовательностей нуклеиновых кислот (идентичность последовательностей нуклеиновых кислот):** Установление идентичности путем сравнения с фрагментом/последовательностью стандартной нуклеиновой кислоты.

Примечание — Например, специфическая гибридизация *со стандартным* образцом, сопоставление профилей рестрикционных гидролизатов или сопоставление последовательностей нуклеиновых кислот.

3.3.2 **область соединения:** Последовательность ДНК, окружающая два следующих элемента последовательности, таких как промотор и кодирующий участок гена.

3.3.3 **граничная область интеграции:** Область соединения, в которой один элемент происходит из *ДНК организма-реципиента*, а другой элемент происходит из ДНК, вставленной в ходе трансформации.

3.3.4 **зависящая от таксона (эндогенная) целевая последовательность:**

Последовательность, о которой известно, что она специфична для целевого таксона.

Примечания

1 Она постоянно присутствует в целевом таксоне и отсутствует в других таксонах.

2 Имеется, по крайней мере, два типа последовательностей, специфических для целевого таксона:

переменное число или мультикопийность последовательностей, которые также могут быть использованы, например, для того, чтобы достичь присутствия нуклеиновой кислоты из целевого таксона.

Небольшое число копий или единственная копия последовательности, которые также могут быть использованы, например, в качестве стандартной последовательности для установления базового (фонового) уровня эквивалентов генома целевого таксона при количественном анализе.

3.3.5 **прямоток:** Принцип обработки проб, применяемый для обеспечения того, чтобы *лабораторная проба*, сырая или приготовленная *анализируемая проба* (включая амплифицированную ДНК) оставалась физически изолированной на протяжении всего анализа.

3.4 Определения, относящиеся к контролям ДНК и ПЦР

Примечание — Контроли, применимые к методам, основанным на определении белка, описаны в ИСО 21572 [4]. Следующие определения применяют для методов, основанных на определении ДНК.

3.4.1 **положительный контроль целевой ДНК:** Стандартная ДНК или ДНК, экстрагированная из сертифицированного стандартного образца, или известного типичного положительного образца исследуемой последовательности или организма.

Примечание — Этот контроль применяют, чтобы продемонстрировать, что реактивы для ПЦР работают как положено.

3.4.2 **отрицательный контроль целевой ДНК:** Стандартная ДНК или ДНК, экстрагированная из сертифицированного стандартного образца или известного отрицательного образца, не содержащая исследуемой последовательности.

Примечание — Этот контроль демонстрирует, что результаты испытаний анализируемых проб, не содержащих целевой последовательности, будут отрицательными.

3.4.3 **контроль ингибирования ПЦР:** Реакционная смесь, которая обеспечивает средство контроля ингибирования ПЦР при испытании специфического образца целевого компонента.

Примечания

1 Этот контроль позволяет определение присутствия растворимых ингибиторов ПЦР, и он особенно необходим в случае отрицательной амплификации и при количественной ПЦР.

2 Обычно известное количество целевой ДНК добавляется к реакции, которая должна быть проконтролирована. Это может быть оригинальная целевая последовательность или некий ее аналог, например слегка модифицированная целевая последовательность, такая как плазмида.

3.4.4 **контроль реагентов ПЦР:** Контроль, содержащий все реактивы для амплификации, за исключением экстрагированной стандартной ДНК *анализируемой пробы*.

Примечание — Этот контроль применяют, чтобы продемонстрировать отсутствие загрязняющих нуклеиновых кислот в реактивах. Вместо стандартной ДНК к реакционной смеси добавляют, например, эквивалентный объем дистиллированной воды, *свободной от ДНК*.

3.4.5 **пустой контроль экстракции:** Контроль, генерируемый путем проведения всех стадий процедуры экстракции, за исключением добавления *анализируемой пробы*.

Примечания

1 Например, путем замены *анализируемой пробы* водой.

2 Применяется, чтобы продемонстрировать отсутствие загрязняющих нуклеиновых кислот в ходе экстракции.

3.4.6 **положительный контроль экстракции:** Контроль применяют, чтобы продемонстрировать, что процедура экстракции ДНК проводилась путем, который позволяет экстрагировать целевую ДНК.

Примечание — Например, путем использования *пробы*, которая заведомо содержит целевую ДНК.

3.4.7 **контроль окружающей среды:** Контроль применяют, чтобы определить, что отсутствует загрязнение нуклеиновыми кислотами, например, из воздуха в лаборатории.

Примечание — Контроль представляет собой пробирку, содержащую соответствующий объем свободной от нуклеиновых кислот воды, которую оставляют открытой для доступа воздуха в течение всего испытания.

3.5 Термины, относящиеся к стандартным образцам

3.5.1 **стандартный образец:** Материал или вещество, один или несколько, чьи свойства достаточно однородны, и достоверно установлено, что он может использоваться для калибровки прибора, оценки точности метода измерения или для установления показателей для материалов [*9*].

3.5.2 **сертифицированный стандартный образец:** Стандартный образец, снабженный сертификатом, одно или несколько свойств которого сертифицированы с помощью надлежаще технически проведенной процедуры, имеющей сертификат или прослеживаемый сертификат, или другую документацию, выданную сертифицирующим (ованным) органом [*9*].

3.6 Термины, относящиеся к количественному определению

Примечание — Контроли, применимые к методам, основанным на определении белка, описаны в ИСО 21572 [*4*]. Следующие определения применяют к методам, основанным на ДНК.

3.6.1 **эндогенная последовательность ДНК:** Определенная стандартная последовательность ДНК, являющаяся природной для соответствующего таксона.

Примечание — Эндогенная последовательность ДНК может использоваться для определения количеств геномных эквивалентов целевого таксона, если последовательность присутствует в постоянном числе копий и не проявляет аллельных вариаций между сортами целевого таксона.

3.7 Термины, относящиеся к ГМО

3.7.1 **содержание ГМО:** Идентичность и количество ГМО или материалов, полученных из ГМО в продукте.

Примечание — Обычно содержание ГМО оценивается путем детектирования анализируемого компонента (идентификации и количественного определения).

4 Применение к подходящим международным стандартам

4.1 Общие положения

Валидация методов, приведенных в приложениях к ИСО 21569 [1], ИСО 21570 [2], ИСО 21571 [3] и ИСО 21572 [4], была проведена совместными испытаниями лабораторий *по ГОСТ Р ИСО 5725-2* и [6] или другими подходящими процедурами валидации [10]. Результаты валидации и рабочие характеристики методов описаны в каждом методе.

Международные стандарты ИСО 21569 [1], ИСО 21570 [2], ИСО 21571 [3] и ИСО 21572 [4] включают ряд индивидуальных методов, считающихся подходящими для обнаружения полученных из ГМО материалов в пищевых продуктах. Конкретный выбор метода(ов) зависит от соответствия цели, и тому, кто пользуется этими стандартами, следует обратиться к области применения каждого приложения для получения дальнейших подробностей.

Стандарты для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов в пищевой продукции приведены во введении. Взаимосвязь между ИСО 21569 [1], ИСО 21570 [2], ИСО 21571 [3] и ИСО 21572 [4] описана схемой последовательности операций на рисунке 1.

Примечание — ИСО/ТС 21098 [12] дает общие требования для методов, приведенных в приложениях к ИСО 21569 [1], ИСО 21570 [2], ИСО 21571 [3].

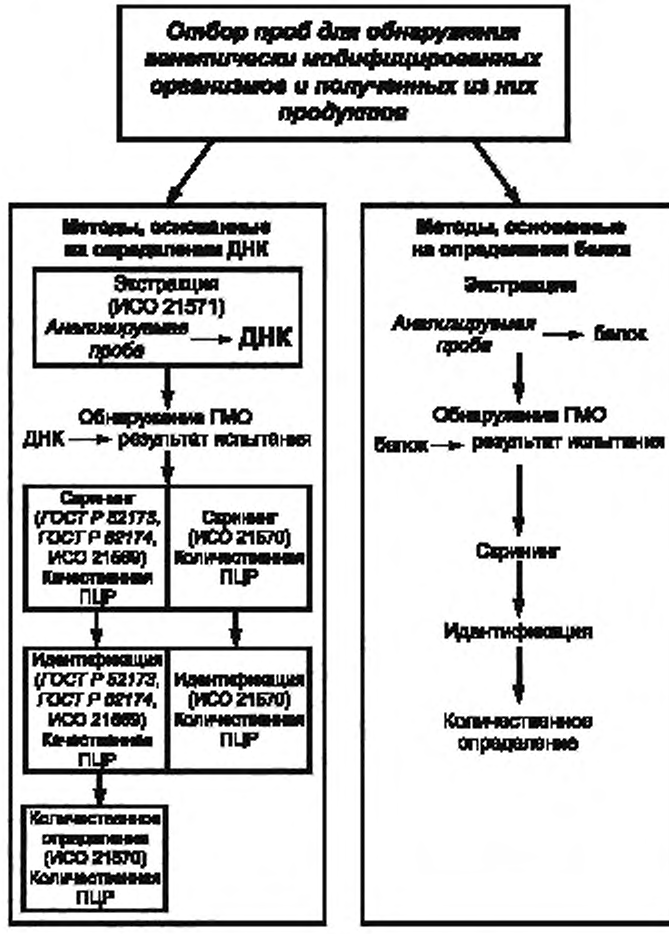

Рисунок 1 — Схема последовательности операций и взаимоотношений между взаимосвязанными стандартами

4.2 Руководство для пользователей по выбору методов

4.2.1 Общие положения

Специфика конкретных целевых компонентов и методы детектирования могут значительно варьировать. И именно поэтому важно быть уверенным в том, что выбранный(е) метод(ы) обеспечивает(ют) желаемую специфичность. Руководство, приведенное в 4.2.2 и 4.2.3, может быть полезным.

4.2.2 Методы, использующие белок в качестве цели анализа

Белки могут быть обнаружены с помощью применения конкретных антител. В этом случае для обнаружения того или иного белка обычно получают конкретное антитело. Степень сродства антител к белку зависит от конформации белка после экстракции. Специфичность используемого антитела должна быть продемонстрирована (например, не должно быть перекрестной реактивности). Обнаружение специфического события ГМО с помощью количественного определения белка не может быть аккуратно осуществлено, если имеет место более чем одно событие ГМО, экспрессирующее один и тот же белок.

Методы скрининга, основанные на присутствии экспрессируемого белка, могут оказаться полезными, чтобы оценить, содержит или нет трансген продукт, вероятно содержащий материал, являющийся производным ГМО.

Количественное определение содержания ГМО в некоторых матриксах может быть осуществлено с помощью методов, основанных на определении белка, таких как ELISA. Метод должен быть валидирован для матрикса, который предстоит анализировать, и должны быть доступными стандарты для построения калибровочной кривой, по которой осуществляется расчет количества белка в анализируемых пробах.

4.2.3 Методы, использующие ДНК в качестве цели анализа

Специфичность аналитических методов, использующих ДНК как мишень для определения присутствия материала, являющегося производным ГМО, зависит от специфических свойств целевой последовательности ДНК. Ниже приведены применения и классификации специфичности.

a) Таксон-специфические методы целевых последовательностей ДНК, обнаруженных у единичного таксона, обычно у вида, но возможно имеющего более низкое или более высокое таксономическое положение. Таксон-специфические методы могут быть полезными при определении присутствия, качества и количества ДНК, происходящей из того или иного таксона, и иногда используются в качестве исходной точки при определении относительного содержания материала, являющегося производным ГМО. Специфичность должна быть установлена с помощью экспериментальных данных.

b) Методы скрининга целевых последовательностей ДНК, найденных в различных, но необязательно во всех трансформационных событиях. Эти последовательности могут также быть найдены и в неявляющемся ГМ материале, например, вследствие присутствия природных вирусов или бактерий. Методы скрининга могут быть полезны, чтобы оценить, содержит или нет трансген продукт, вероятно содержащий материал, являющийся производным ГМО. Примером методов скрининга является качественная ПЦР, с помощью которой обнаруживается 35S промотор из вируса мозаики цветной капусты.

c) Методы, *специфичные для определения генетической* конструкции, *позволяют обнаружить* последовательности ДНК, которые *могут быть выявлены* только в материале, являющемся производным ГМО, т.е. в комбинациях элементов последовательности ДНК, сконструированных с помощью генной инженерии. Обнаружение конкретной генной конструкции может оказаться достаточным для идентификации трансформационного события, из которого происходит ДНК, однако та же самая генная конструкция может быть использована в более чем одном трансформационном событии, и число внедрившихся копий полной и/или усеченных генных конструкций на один гаплоидный ГМ-геном у разных событий может варьировать.

d) Методы, *специфичные для трансформационного* события, обнаруживают последовательность ДНК, охватывающую область соединения между введенной ДНК *и ДНК генома реципиента* (граничная область интеграции). Число копий последовательности ДНК специфического события — всегда одна на гаплоидный ГМ-геном. Методы специфического события особенно пригодны для идентификации специфических событий и, когда используются в валидированном методе ПЦР в реальном времени, могут также оценить количество ДНК, происходящей из конкретного ГМО.

4.3 Рабочие характеристики

4.3.1 Общие положения

Приемлемые рабочие характеристики и уровни методов таковы, как приведены в приложениях к ИСО 21569 [*1*] , ИСО 21570 [*2*], ИСО 21571 [*3*] и ИСО 21572 [*4*].

4.3.2 Предел детектирования (LOD)

Величины LOD для каждого аналитического метода, как указано в приложениях к ИСО 21569 [*1*], ИСО 21570 [*2*], ИСО 21571 [*3*] и ИСО 21572 [*4*], основаны на данных валидации, проведенной совместными испытаниями лабораторий и/или заявлений разработчиков методов, и включены только для инфор-

мационных целей. Величины LOD, полученные из данных совместных испытаний лабораторий, обычно ссылаются на наиболее низкое количество компонента, которое дает ложноотрицательный результат *не более* 5 % с относительным стандартным отклонением воспроизводимости *не более* 33 %. Однако некоторые уровни компонента, превышающие эту величину или не достигающие ее, могут иметь относительное стандартное отклонение воспроизводимости *превышающее* 33 %; с подробностями можно ознакомиться в соответствующем приложении. Для количественных методов LOD соответствует наиболее низкому уровню компонента, для которого относительное стандартное отклонение воспроизводимости должно быть *не более* 33 % [*6*].

Фактический LOD — наименьшее относительное количество целевой ДНК, которое может быть обнаружено, дающее известное (определенное/рассчитанное) число копий генома целевого таксона. Для расчета числа копий, основанного на молекулярной массе генома соответствующего вида, следует использовать размеры генома, приведенные в [*11*]. Фактический LOD связан с *анализируемой пробой*, качеством/количеством матричной ДНК и абсолютным LOD метода.

Для тех матриц, для которых отсутствуют валидированный метод или находящийся во взаимно однозначном соответствии LOD, лаборатории должны сообщать фактический LOD, основанный на внутреннем опыте работы, или констатировать, что для этих матриц он неизвестен, и сделать ссылку на валидированный LOD на специфической матрице.

4.3.3 Предел количественного определения (LOQ)

Величины LOQ для каждого аналитического метода, как указано в приложениях к ИСО 21569 [*1*], ИСО 21570 [*2*] и ИСО 21572 [*4*], основаны на данных валидации, проведенной совместными испытаниями лабораторий и/или заявлений разработчиков методов, и включены только для информационных целей. Величины LOQ, полученные из данных совместных испытаний лабораторий, обычно ссылаются на наиболее низкое количество компонента, которое дает относительное стандартное отклонение воспроизводимости *не более* 25 %. Однако некоторые уровни компонента, превышающие эту величину или не достигающие ее, могут иметь относительное стандартное отклонение воспроизводимости, превышающее 25 %; с подробностями можно ознакомиться в соответствующем приложении и см. [*2*] и [*6*].

Фактический LOQ — наименьшее относительное количество целевой ДНК, которое может быть достоверно количественно определено, дающий известное (определенное/рассчитанное) число копий генома целевого таксона. Для расчета числа копий, основанного на молекулярной массе генома соответствующего вида, должны использоваться размеры генома, приведенные в [*11*]. Фактический LOQ связан с *анализируемой пробой*, качеством/количеством матричной ДНК и абсолютным LOQ метода.

Для тех матриц, для которых отсутствуют валидированный метод или находящийся во взаимно однозначном соответствии LOQ, лаборатории должны сообщать фактический LOQ, основанный на внутреннем опыте работы, или констатировать, что для этих матриц он неизвестен и сделать ссылку на валидированный LOQ на специфической матрице.

5 Общие требования к лаборатории и процедурам

5.1. Общие положения

Процедура включает в себя следующие стадии:

- получение репрезентативной *пробы*;
- гомогенизация *лабораторной пробы*;
- уменьшение лабораторной пробы до размеров *анализируемой пробы*;
- подготовка и измельчение *пробы*;
- экстракция анализируемого компонента;
- испытание, интерпретация и отчет о результатах.

Инструкции, специфические для той или иной процедуры, содержатся в основном тексте и в индивидуальных приложениях к ИСО 21569 [*1*], ИСО 21570 [*2*], ИСО 21571 [*3*] и ИСО 21572 [*4*].

5.2 Использование контролей

Должны быть использованы контроли в соответствии с таблицей 1. Эта таблица применима только к методам, основанным на определении ДНК. Контроли, применимые к методам, основанным на определении белка, описаны в ИСО 21572 [*4*].

Таблица 1 — Схема, иллюстрирующая пересечение между последовательными стадиями и включением контролей[a]

Контрольная стадия	Контроль окружающей среды[b]	Пустой контроль экстракции[c]	Положительный контроль экстракции[d]	Положительный контроль целевой ДНК[e]	Отрицательный контроль целевой ДНК[f]	Контроль реагентов амплификации[g]	Контроль ингибирования ПЦР[h]
Гомогенизация	Рекомендуется						
Экстракция нуклеиновых кислот	↓[a]	Один на серию	Обязательный с регулярными интервалами				
Оценка качества нуклеиновых кислот	↓	↓	↓				
Амплификация нуклеиновых кислот	↓	↓	↓	Обязательный	Рекомендуется	Обязательный	Рекомендуется, но в некоторых случаях обязательный[i]
Оценка результатов амплификации нуклеиновых кислот	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Интерпретация		↓	↓	↓	↓	↓	↓
Отчет об исследовании		↓	↓	↓	↓	↓	↓

[a] Стрелки указывают, что этот контроль следует применять и на последующих стадиях.

[b] Использование контроля окружающей среды поможет лаборатории идентифицировать источники контаминации на ранней стадии и для идентификации, в каком рабочем помещении присутствует контаминация.

[c] По крайней мере один пустой контроль должен быть включен каждый раз, когда ДНК экстрагируется из одного или более образцов. Пробирка должна всегда быть последней в каждой серии. Может быть подходящим помещать одну пустую экстракцию, например, в штатив из восьми пробирок или на микроплашку на 96 лунок для автоматической экстракции.

[d] Положительный контроль экстракции должен регулярно включаться и во всех случаях, когда используется новая партия реактивов для экстракции. Если что-то не так с реактивами или с проведением протокола экстракции, то этот контроль это выявит.

[e] Положительный контроль целевой ДНК демонстрирует способность процедуры амплификации нуклеиновой кислоты обнаружить образец нуклеиновой кислоты ГМО или целевого таксона. Это условие может также быть выполнено с помощью соответствующего положительного контроля экстракции.

[f] Отрицательный контроль целевой ДНК демонстрирует способность процедуры амплификации нуклеиновой кислоты избежать ложноположительной амплификации в отсутствие образца нуклеиновой кислоты ГМО или целевого таксона.

[g] Контроль реагентов амплификации демонстрирует отсутствие загрязняющей нуклеиновой кислоты в используемой партии реактивов для ПЦР. Контроль реагентов амплификации может быть опущен, когда используется пустой контроль экстракции.

[h] Контроль ингибирования ПЦР может использоваться для демонстрации отсутствия растворимых ингибиторов. Это также может быть продемонстрировано путем серийных разведений матричной нуклеиновой кислоты. Однако должны быть сделаны некоторые типы оценки эффекта растворимых ингибиторов на результаты анализа образца.

[i] Контроль ингибирования ПЦР является обязательным, если все исследования образца с помощью ПЦР были отрицательными и для продуктов, для которых выход амплифицируемой ДНК неизвестен.

5.3 Организация лаборатории

5.3.1 Общие положения

Следует соблюдать надлежащие требования в отношении правил безопасности и рекомендаций производителя по безопасности и необходимо поступать в соответствии с руководящими принципами, изложенными в *ГОСТ Р ИСО/МЭК17025*.

5.3.2 Проектирование лаборатории

Случайная контаминация ДНК может происходить из-за пыли или распыленных аэрозолей. Как следствие, организация рабочих помещений в лаборатории логически основана:

- на систематической защите всех методологических стадий, используемых для получения результатов, и
- принципе «прямотока» при работе с *пробой*.

Для методов, основанных на определении ДНК, применяют следующую конструкцию лаборатории.

Необходимы минимум четыре отдельно спроектированных специализированных рабочих помещения со своим собственным оборудованием, а именно:

a) рабочая зона для измельчения и гомогенизации;

b) рабочая зона для экстракции нуклеиновых кислот из анализируемого материала;

c) рабочая зона, предназначенная для постановки реакций ПЦР/амплификации;

d) рабочая зона, предназначенная для последующей обработки, включая анализ и характеризацию амплифицированных последовательностей ДНК, если это предусмотрено.

Если используют оборудование для измельчения, продуцирующее частицы пыли, эту работу следует производить в дополнительной рабочей зоне.

Физическое разделение путем использования разных комнат является наиболее эффективным и предпочтительным путем обеспечения раздельных рабочих зон, однако могут быть использованы и другие методы для защиты от контаминации при условии, что их эффективность сопоставима.

5.3.3 Персонал

Сотрудники лаборатории должны носить разную лабораторную одежду в разных рабочих зонах, таких как зона для измельчения или рабочая зона, предназначенная для последующей обработки. Они также должны использовать одноразовые перчатки.

Когда это возможно, использование посыпанных пудрой перчаток должно быть исключено для операций реакций до постановки ПЦР, поскольку эта пудра может ингибировать реакцию ПЦР или контаминировать ее, когда она производится, например, с материалом из кукурузного крахмала. Перчатки и лабораторная одежда должны заменяться с соответствующей периодичностью. Все ПЦР-процедуры должны производиться в условиях, исключающих контаминацию, насколько это возможно.

Весь персонал, производящий все стадии испытательной процедуры, должен быть обучен для работы соответствующими методами.

5.3.4 Приборы и другое оборудование

Лаборатория должна использовать должным образом содержащееся оборудование, пригодное для применяемых методов.

Приборы и другое оборудование должно содержаться в соответствии с инструкциями изготовителя.

5.3.5 Материалы и реактивы

Для анализа, если это не установлено иначе, используются только реактивы, имеющие квалификацию «для аналитических целей», пригодные для молекулярной биологии и свободные от ДНК и ДНКаз. Реактивы и растворы должны храниться при комнатной температуре, если это не определено иначе. Реактивы для ПЦР должны храниться в виде небольших аликвот для минимизации риска контаминации. Используемая вода должна быть бидистиллированной или сопоставимого качества. Растворы следует готовить растворением соответствующих реактивов в воде с последующим автоклавированием, если не определено иначе. Если автоклавирование невозможно, можно использовать оборудование для стерильной фильтрации (возможный размер пор 0,22 мкм).

Для того чтобы предотвратить контаминацию, в зоне постановки ПЦР должна быть принята стерильная методика, в частности, должны использоваться не посыпанные пудрой перчатки, стерилизованная пластиковая посуда, автоклавированные реактивы, одноразовая пластиковая посуда, защищенные от аэрозолей наконечники для микропипеток.

Материалы и все контейнеры, а также все одноразовые упаковки, содержащие реактивы, должны предохраняться от любого контаминирующего агента (например, от пыли).

Необходимо следовать рекомендациям производителя по применению реактивов. Для оценки работоспособности реактивов и отсутствия в них ДНКаз могут использоваться соответствующие контроли.

В препаратах не должно присутствовать никакой непредусмотренной ферментативной активности (например, экзонуклеазной), которая может препятствовать ПЦР. Реакционный буфер должен соответствовать торговой марке используемой полимеразы.

6 Интерпретация и представление результатов

6.1 Общие положения

Для количественных методов расчет и представление результатов приведены в ИСО 21570 [2] и ИСО 21572 [4]. Ни один неоднозначный результат не должен быть представлен.

6.2 Интерпретация контролей

Каждый контроль имеет неоспоримое значение и, если наблюдаемый результат для любого контроля отличается от этого значения, анализ должен быть повторен. Контроль окружающей среды может быть положительным (обнаружен продукт амплификации ожидаемой величины) или отрицательным (продукта амплификации не обнаружено), но положительный результат должен всегда инициировать меры по удалению и предотвращению контаминации лабораторных помещений. В том случае, если необоснованный результат для любого из других контролей получен повторно, должны быть предприняты меры по удалению/замещению источника(ов), ответственного(ых) за ошибку, после чего анализ должен быть повторен. Результаты анализа могут быть представлены только в том случае, когда все контроли дадут неоспоримые результаты. Неоспоримые результаты для контролей таковы:

- положительные контроли реакции всегда должны быть положительными;
- пустые контроли экстракции всегда должны быть отрицательными;
- положительные контроли целевой ДНК всегда должны быть положительными;
- отрицательные контроли целевой ДНК всегда должны быть отрицательными;
- контроли реактивов амплификации всегда должны быть отрицательными.

Контроли ингибирования ПЦР не должны проявлять значительных ингибиторных эффектов в отношении реакции (для качественного анализа эффекты ингибирования могут быть менее выраженными, чем для количественного анализа).

Возможные результаты ПЦР для контролей перечислены в таблице 2. Они используются для интерпретации/представления отчетов для результатов для анализируемой пробы.

Таблица 2 — Примеры результатов ПЦР

Анализируемая проба	Положительный контроль экстракции	Пустой контроль экстракции	Отрицательный контроль целевой ДНК	Положительный контроль целевой ДНК	Интерпретация результата
+[a]	+	—	— [b]	+	Положительный
—	+	—	—	+	Отрицательный
+	+	+	—	+	Недостаточен для принятия решения [c]
—	—	+	—	—	Недостаточен для принятия решения [c]
—	—	—	—	—	Недостаточен для принятия решения[d]

[a] Продукт ПЦР обнаружен.

[b] Продукт ПЦР не обнаружен.

[c] Процедура должна быть повторена, начиная со стадии экстракции (возможна контаминация).

[d] Процедура должна быть повторена, с использованием другого метода экстракции или дополнительной стадии очистки (возможна контаминация).

Все стадии испытаний и полученные результаты должны быть запротоколированы.

6.3 Выражение отрицательного результата

Отрицательный результат никогда не должен выражаться как «нуль» или «ГМО отсутствует».

В протоколе испытаний должна содержаться следующая фраза: «В *анализируемой* пробе материал, являющийся производным ГМО, не обнаружен».

Протокол испытаний должен включать следующую информацию:

- LOD метода, валидированного на специфическом матриксе, и
- фактический LOD для матрикса, основанный на опыте лаборатории или на проанализированных *пробах* (или утверждение, что он неизвестен).

Фактический LOD должен быть выше или равен LOD валидированного метода.

6.4 Выражение положительного результата

Следующая или эквивалентная ей фраза должна содержаться в протоколе испытаний: «В *анализируемой пробе* обнаружено присутствие материала, являющегося производным ГМО (по возможности указать специфическую целевую последовательность)».

Идентичность ГМО может быть включена в протокол, если известна.

6.5 Выражение неоднозначного результата

Результаты испытания анализируемой пробы должны быть непротиворечивыми. Если, по крайней мере, одна *анализируемая проба* даст положительный результат и, как минимум, одна даст отрицательный результат — анализ должен быть повторен на той же *лабораторной пробе*.

В том случае, если, по крайней мере, две повторности испытания (начиная с экстракции нуклеиновых кислот) дают неоднозначные результаты, такие как положительный результат и отрицательный результат, протокол испытаний должен констатировать, что *проба* является отрицательной на пределе детектирования, как прямо оговорено в ИСО 21569 [*1*] и ИСО 21570 [*2*].

6.6 Требования гарантии качества

Общие аспекты гарантии качества *изложены в ГОСТ Р ИСО/МЭК* 17025.

Когда методы валидированы и показано, что они пригодны для единичного матрикса, эти методы не следует применять к подобным или другим матриксам до того, как будет установлена их применимость для этих дополнительных матриксов.

7 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать, по крайней мере, следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для идентификации *лабораторной пробы*;

b) любую особую информацию, имеющую отношение к *лабораторной пробе* (например, недостаточной размер, деградированное состояние);

c) ссылку на настоящий стандарт и на соответствующее(ие) приложение(ия);

d) отчет о дате и типе использовавшихся процедур(ы) отбора *проб*;

e) дату получения;

f) условия хранения, если применимо;

g) дату начала/окончания анализа, если применимо;

h) лицо, ответственное за анализ;

i) размер *лабораторной пробы и анализируемой пробы*;

j) результаты в соответствии с требованиями специфического метода и единицы измерений, использовавшиеся для отчета о результатах, а также применявшиеся юстировочные приборы и методы расчета;

k) все особые наблюдения, сделанные в ходе испытаний;

l) любые отклонения от добавления к или исключения из технических условий испытаний;

m) требования, определенные в пункте, посвященном протоколу испытаний, в ИСО 21569 [*1*] или в ИСО 21570 [*2*],

n) все необходимые формулировки, как это определено в статье 6.

Информация должна быть дана в отношении единиц измерений.

Погрешности измерений и их доверительные интервалы должны быть доступными для пользователя результатами по его запросу.

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 21570:2005** *Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные 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)*

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

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

[4] *ИСО/ТС 21572:2005** *Продукты пищевые. Методы анализа, предназначенные для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на определении белков*

(ISO/TS 21572:2005) *(Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Protein based methods)*

[5] Codex Alimentarius Commission, Procedural Manual, Twelfth Edition for Principles for the Establishment of Codex Methods of Analysis, Guidelinesof the Criteria Approach, 2001, p. 64 (см. CX/MAS 01/4)

[6] Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, 67, 1995, pp. 331—343

[7] Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, *In House Method validation. In House validated methods and their role in methods of analysis for Codex purposes*. Codex Alimentarius Commission (CX/MAS 98/8), 1998, Budapest, Hungary, 23—27 *November, 1998*

[8] Inhorn, S.L. *Quality Assurance Practices for Health Laboratories*, APHA, Washington DC, 1978, p. 588

[9] ИСО Руководство 30:1992 *Термины и определения, применяемые в области стандартных образцов***

[10] *Thompson, M., Ellison, S.L. and Wood, R. Harmonised guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure and Applied Chemistry, 47, No. 5, 2002, pp. 835—855*

[11] *Arumuganathan, K. And Earle, E.D. Nuclear content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep., 9(3), 1991, pp. 208—218*

[12] ИСО/TS 21098 *Продукты пищевые. Методы исследования генетически модифицированных организмов и продуктов, являющихся их производными, основанные на определении нуклеиновых кислот. Информация, которая должна быть предоставлена, и процедура добавления методов к ИСО 21569, ИСО 21570 или ИСО 21571*

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

** *Перевод данного Руководства 30:1992 находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.*

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

Ключевые слова: пищевые продукты, методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов, корма для животных, семена, общие требования и определения

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 03.04.2009. Подписано в печать 27.07.2009. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,80. Тираж 403 экз. Зак. 396.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.