

DIN EN ISO 17601



ICS 13.080.30

**Bodenbeschaffenheit –
Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen durch
quantitative PCR aus DNA-Boden-Extrakten (ISO 17601:2016);
Deutsche Fassung EN ISO 17601:2018**

Soil quality –

Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative PCR from DNA
directly extracted from soil (ISO 17601:2016);

German version EN ISO 17601:2018

Qualité du sol –

Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction
de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative à partir d'ADN directement extrait du sol
(ISO 17601:2016);

Version allemande EN ISO 17601:2018

Gesamtumfang 45 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 17601:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Unterausschuss NA 119-01-02-04 UA „Biologische Verfahren“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-02 AA „Abfall- und Bodenuntersuchung (Koordinierung ISO/TC 190; ISO/TC 275, CEN/TC 292, CEN/TC 308, CEN/TC 345, CEN/TC 444, CEN/SABE/ENV)“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10381-6 siehe DIN ISO 10381-6

ISO 11063 siehe DIN EN ISO 11063

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 10381-6, *Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden unter aeroben Bedingungen für die Beurteilung mikrobiologischer Prozesse sowie der Biomasse und der Diversität unter Laboratoriumsbedingungen*

DIN EN ISO 11063, *Bodenbeschaffenheit — Verfahren zur direkten Extraktion von DNA aus Bodenproben*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

**Bodenbeschaffenheit —
Ermittlung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller
Gensequenzen durch quantitative PCR aus
DNA-Boden-Extrakten
(ISO 17601:2016)**

Soil quality —
Estimation of abundance of selected microbial gene
sequences by quantitative PCR from DNA directly
extracted from soil
(ISO 17601:2016)

Qualité du sol —
Estimation de l'abondance de séquences de gènes
microbiens par amplification par réaction de
polymérisation en chaîne (PCR) quantitative à partir
d'ADN directement extrait du sol
(ISO 17601:2016)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Februar 2018 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Prüfmaterialien	10
5.1 DNA	10
5.2 Bakterien	10
5.3 Plasmid	10
5.4 Enzym	10
5.5 Chemikalien	10
5.6 Komponenten für ein Bakterien-Nährmedium	11
5.7 Pufferlösungen und Reagenzien	11
6 Prüfeinrichtung	12
7 Durchführung	13
7.1 Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1)	13
7.1.1 Allgemeines	13
7.1.2 Amplifikat-Design (Aufgabe 1, Schritt 1)	13
7.1.3 Herstellung des qPCR-Standards (Aufgabe 1, Schritt 2)	13
7.1.4 DNA aus Isolaten und Umweltproben, künstliche DNA	14
7.1.5 Kalibrierung der qPCR (Aufgabe 1, Schritt 3)	16
7.2 Herstellung der Boden-DNA-Matrize und Hemm-Test (Aufgabe 2)	17
7.2.1 Allgemeines	17
7.2.2 Aufbereitung von Boden-DNA (Aufgabe 2, Schritt 4)	17
7.2.3 Hemm-Test (Aufgabe 2, Schritt 5)	17
7.2.4 Verdünnung der DNA-Matrize	19
7.3 qPCR- Analyse (Aufgabe 3)	20
7.3.1 Allgemeines	20
7.3.2 qPCR	20
7.4 Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4)	20
7.4.1 Allgemeines	20
7.4.2 Validierung der qPCR-Analyse	20
7.4.3 Berechnung der Kopienzahl des interessierenden Gens im Boden-DNA-Extrakt	21
8 Kritische Schritte der qPCR-Analyse	22
9 Angabe der Ergebnisse der qPCR-Analyse	22
10 Internationaler Ringversuch	22
11 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Beschreibung der wichtigsten Schritte einer TaqMan® qPCR-Analyse	24
A.1 Allgemeines	24

A.2	Herstellung des qPCR-Standards und Kalibrierung (Aufgabe 1).....	24
A.2.1	Amplifikat-Design (Aufgabe 1, Schritt 1).....	24
A.2.2	Kalibrierung der qPCR-Analyse (Aufgabe 1, Schritt 3).....	24
A.3	qPCR-Analyse (Aufgabe 3)	25
A.4	Validierung und Analyse der qPCR-Analyse (Aufgabe 4)	25
Anhang B (informativ) Internationaler Ringversuch zur Bewertung einer qPCR zur		
quantitativen Bestimmung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus		
direkt aus dem Boden extrahierter DNA		
B.1	Am Ringversuch beteiligte Laboratorien	26
B.2	Organisation des Ringversuchs.....	26
B.3	Material und Verfahren.....	27
B.3.1	Böden	27
B.3.2	Extraktion, Aufreinigung und quantitative Bestimmung von Boden-DNA sowie Hemm- Test	27
B.3.3	Quantitative qPCR-Analyse	28
B.3.4	Statistische Analysen	29
B.4	Ergebnisse.....	29
B.4.1	Analyse der Standardkurven für die qPCR von <i>16S-rRNA</i> und <i>nirK</i>	29
B.4.2	Wiederholpräzision von qPCR-Analysen.....	31
B.4.3	Vergleichpräzision von qPCR-Analysen.....	34
B.4.4	Vergleich der in den verschiedenen Böden quantitativ bestimmten Kopienzahlen der <i>16S-rRNA</i> - und <i>nirK</i> -Sequenz.....	37
B.5	Schlussfolgerungen und Empfehlungen.....	38
B.5.1	Schlussfolgerungen.....	38
B.5.2	Empfehlungen.....	39
Literaturhinweise.....		40

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 17601:2016 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 190 „Soil quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 17601:2018 durch das Technische Komitee CEN/TC 444 „Prüfverfahren für die umweltbezogene Charakterisierung fester Matrices“ übernommen, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2018 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 17601:2016 wurde von CEN als EN ISO 17601:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 190, *Soil quality*, Unterkomitee SC 4, *Biological methods*.

Einleitung

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist ein wichtiger Bestandteil lebender Organismen, der die Enzyme kodiert, die für deren biologischen Aktivitäten verantwortlich sind. Durch die Untersuchung von DNA-Sequenzen aus DNA-Quellen, die mit einer Vielzahl von molekularen Verfahren aus unterschiedlichen Umweltmatrices extrahiert werden, werden molekulare Marker erhalten, die zur genauen Unterscheidung und Identifizierung verschiedener Organismen (Bakterien, *Archaea* und *Eukaryoten*) verwendet werden können.

Bislang waren die meisten Untersuchungen mit dem Ziel der Entwicklung von mikrobiellen Qualitätsindikatoren, die auf komplexe Umgebungen, wie z. B. Boden, anwendbar sind, durch die mangelhafte Kultivierbarkeit vieler Mikroorganismen unter Laborbedingungen und mangelnde Empfindlichkeit traditioneller mikrobiologischer Verfahren eingeschränkt. Die jüngste Entwicklung einer Vielzahl von molekularbiologischen Verfahren, die auf der Vervielfältigung von aus dem Boden extrahierten Nukleinsäuren beruhen, stellen eine angemessene Alternative zu den klassischen mikrobiologischen Verfahren auf der Grundlage von Kulturen dar und bieten einen einzigartigen Einblick in die Zusammensetzung, den Artenreichtum und die Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften [2], [3], [4], [5], [6]. Auf DNA basierende Verfahren sind gegenwärtig in der Bodenökologie gängige Verfahren und dienen als genotypische Marker für die Bestimmung der mikrobiellen Diversität. Die Ergebnisse der molekularen Analysen von Lebensgemeinschaften und/oder Populationen von Bodenmikroorganismen basieren auf zwei Hauptkomponenten: a) der Extraktion von DNA, die repräsentativ für die Zusammensetzung der indigenen bakteriellen Lebensgemeinschaft ist, und b) dem Einfluss der PCR (PCR-Bias), wie z. B. der Wahl der Primer, der Konzentration der amplifizierten DNA, Fehlern in der PCR oder sogar dem für die Analyse gewählten Verfahren [7], [4], [8], [9].

In einer Vielzahl von Studien wurden neue Verfahren untersucht, um die Extraktion, Aufreinigung, Amplifikation und quantitative Bestimmung von DNA aus Böden zu verbessern [10]. Mit ISO 11063, in der ein aus Literaturhinweis [10] abgeleitetes „Verfahren zur direkten Extraktion von DNA aus Bodenproben“ angegeben ist, ergeben sich unlängst neue Möglichkeiten für die Entwicklung genormter molekularer Verfahren zur Einschätzung der Bodenbeschaffenheit [11].

Das Ziel dieser Internationalen Norm ist die Beschreibung eines Verfahrens, das für die Organisation und Durchführung von quantitativen PCR-Analysen für die quantitative Bestimmung der Häufigkeit (Abundanz) von Mikroorganismenstämmen im Boden sowie von funktionellen Gruppen aus direkt aus Bodenproben extrahierter DNA angewendet wird. Die quantitative Bestimmung von Mikroorganismenstämmen im Boden sowie von funktionellen Gruppen durch qPCR-Analysen kann zur Entwicklung von Routinewerkzeugen zur Überwachung der Bodenbeschaffenheit beitragen. Die Reproduzierbarkeit (Wiederholpräzision) und die Vergleichbarkeit (Vergleichpräzision) des Verfahrens der quantitativen PCR wurden in einem internationalen Ringversuch beurteilt (siehe Anhang B). Die Wiederholpräzision dieses Verfahrens wurde sowohl für 16S-rRNA-Gene als auch für Gene, die einen funktionellen Marker von Denitrifikanten (das Nitritreductase-Gen *nirK*) darstellen, erfolgreich evaluiert. Die Vergleichpräzision dieses Verfahrens hat einen Laboreffekt offengelegt, der durch Auswertung der Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Häufigkeit der mikrobiellen Gruppen durch Vergleich, entweder durch Verwendung einer externen Vergleichsbasis (aus einem Kontrollstamm extrahierte DNA) im Versuch oder durch Berechnung eines Prozentsatzes der Abweichungen zwischen Behandlungen zum Normieren der Daten überwunden werden kann.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt die entscheidenden Schritte eines Verfahrens der quantitativen Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) zur Messung der Häufigkeit ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus Boden-DNA-Extrakten fest, welche eine Quantifizierung ausgewählter mikrobieller Gruppen ermöglicht.

Dabei gilt, dass die Anzahl von Genen nicht zwangsläufig direkt mit der Anzahl an gemessenen Organismen korreliert. Zum Beispiel wurden für ribosomale Operons in unterschiedlichen Bakterienstämmen von einer bis zu 20 Kopien pro Zelle beschrieben. Daher ergibt die Quantifizierung von 16S-rRNA-Sequenzen aus extrahierter DNA aus Bodenproben mittels qPCR nur einen Anhaltspunkt für die Häufigkeit von Bodenbakterien. Außerdem ist die DNA auch nach dem Zelltod in Böden persistent und daher kein Maß für die lebende Biomasse.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 10381-6, *Soil quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory*

ISO 11063, *Soil quality — Method to directly extract DNA from soil samples*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Boden-DNA

aus dem Boden extrahierte DNA von lebenden und toten Biota

BEISPIEL Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere.

3.2

Polymerase-Kettenreaktion

PCR

Verfahren, das die Vervielfältigung (Amplifikation) einer spezifischen DNA-Sequenz unter Verwendung eines spezifischen Paares von Oligonukleotid-Primern ermöglicht

3.3

quantitative Polymerase-Kettenreaktion

qPCR

Verfahren, das die quantitative Bestimmung der Anzahl einer spezifischen DNA-Sequenz in einer DNA-Matrize (3.4) unter Verwendung eines spezifischen Paares von Oligonukleotid-Primern ermöglicht

3.4

Matrize

DNA-Probe, die zur Durchführung einer PCR (3.2) verwendet wird, um eine spezifische DNA-Sequenz zu amplifizieren

3.5

Amplifikat

PCR-Produkt, das durch PCR (3.2) aus einer Matrize (3.4) generiert wird

3.6

Klonierungsvektor

ringförmiges DNA-Molekül, in das das *Amplifikat* (3.5) durch Ligation eingefügt wird und das verwendet wird, um kompetente Zellen von *Escherichia coli* für das Klonieren eines Amplifikats zu transformieren

3.7

qPCR-Standard

geklontes DNA-Fragment, das als *Matrize* (3.4) für die qPCR-Reaktion verwendet wird, um die Standardkurve zu erstellen, in der die Häufigkeit der Zielsequenz als Funktion des Schwellenwert-Zyklus (Ct) aufgetragen ist

3.8

Kontrolle ohne Matrize

NTC

Kontrolle, üblicherweise Wasser mit molekularbiologischer Reinheit, die als Negativkontrolle in der qPCR-Analyse zur Überprüfung auf das Nichtvorhandensein von Verunreinigungen in den jeweiligen Reagenzien verwendet wird

3.9

Schwellenwert-Zyklus

Ct

Anzahl von qPCR-Zyklen, die erforderlich ist, damit das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert (d. h. den Hintergrundwert) überschreitet

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zur Häufigkeit der Zielsequenz.

4 Kurzbeschreibung

Diese Internationale Norm beschreibt ein qPCR-basiertes Verfahren unter Verwendung eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs als Reporter. Das qPCR-Verfahren wurde durch einen internationalen Ringversuch validiert, der mit SYBR Green, einem häufig verwendeten, DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt wurde, der an jede doppelsträngige DNA bindet und durch Messung des Anstiegs der Fluoreszenz nachgewiesen werden kann.

Ziel dieses Verfahrens ist die Quantifizierung ausgewählter mikrobieller Gensequenzen aus Boden-DNA-Extrakten. Das Verfahren umfasst vier Hauptaufgaben, die sich insgesamt in acht Schritte differenzieren lassen, die in Bild 1 zusammengefasst sind. In Übereinstimmung mit Literaturhinweis [1] sind die drei kritischen, für jedes auf dem qPCR-Verfahren neu zu validierenden Schritte, in Bild 1 markiert.

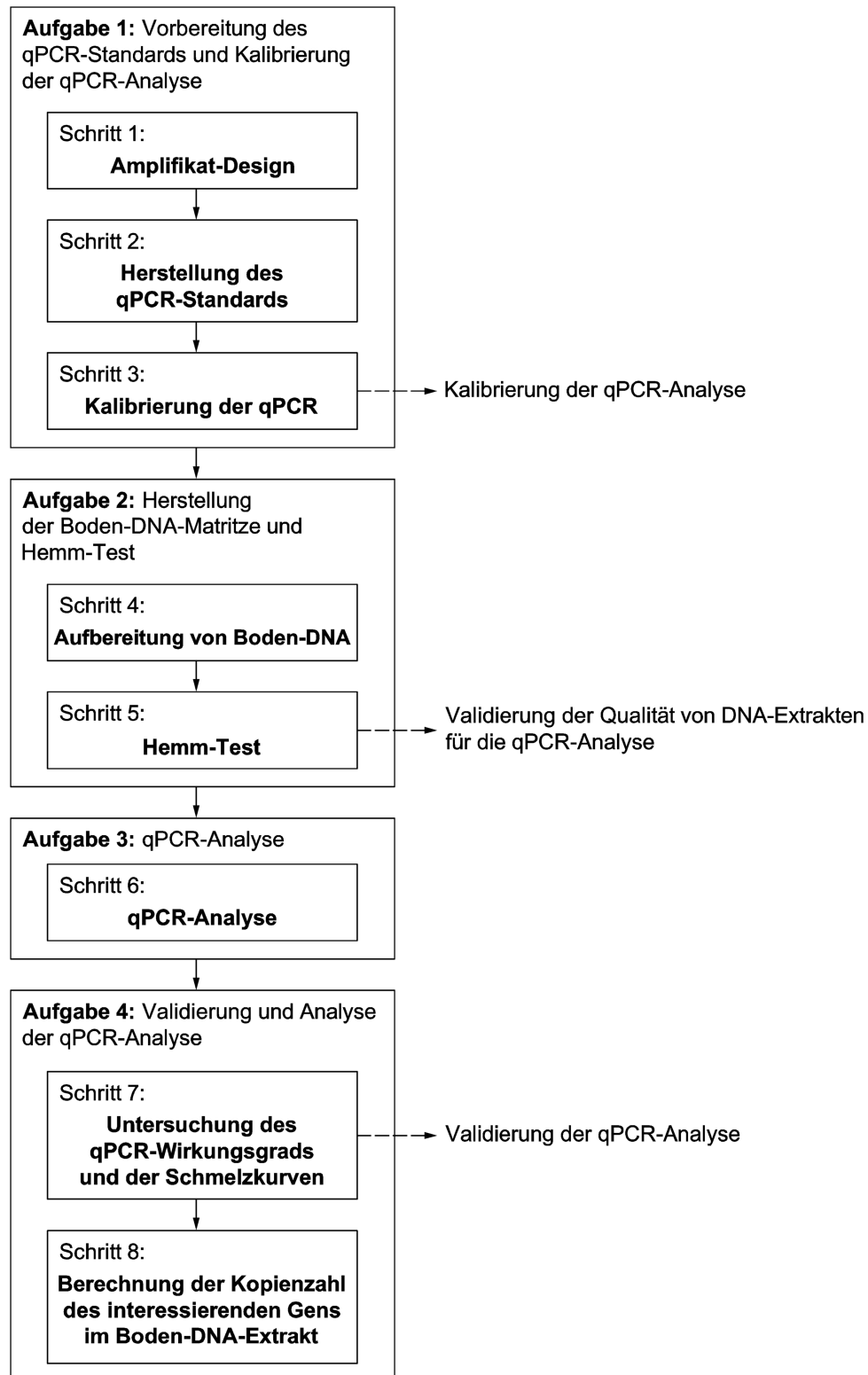


Bild 1 — Hauptaufgaben und kritische Schritte bei der Quantifizierung ausgewählter mikrobieller Gensequenzen mittels qPCR

Diese Internationale Norm beschreibt ein qPCR-Verfahren auf der Grundlage der Verwendung eines DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs, der durch einen internationalen Ringversuch unter Verwendung von SYBR

Green®¹⁾ validiert wurde. In Anhang A sind Informationen über ein analoges Verfahren unter der Verwendung eines TaqMan®²⁾ basierten Assays dargestellt, das nicht im internationalen Ringversuch geprüft wurde. Die erste Hauptaufgabe der Analyse besteht aus drei Schritten, in denen das Design eines optimalen Amplifikats für qPCR (Schritt 1), die Herstellung von qPCR-Standards (Schritt 2) und das Verfahren zur Kalibrierung der qPCR-Analyse (Schritt 3), beschrieben werden. Die zweite Hauptaufgabe umfasst zwei weitere Schritte, in denen die Verfahren zur Vorbereitung von Boden-DNA-Proben (Schritt 4) und zur Prüfung auf das Vorhandensein von qPCR-Inhibitoren in Boden-DNA-Proben (Schritt 5) beschrieben werden. Die dritte Hauptaufgabe besteht aus einem einzigen Schritt, in dem die Arbeitsvorschrift zur Durchführung der qPCR-Analysen (Schritt 6) beschrieben wird. Abschließend besteht die vierte Hauptaufgabe aus zwei Schritten; in einem wird das Verfahren zur Validierung von qPCR-Analysen (Schritt 7) zur Überprüfung der Qualität der qPCR-Analyse beschrieben, in Schritt 8 die verschiedenen Möglichkeiten zur Berechnung der Kopienzahl der Sequenzen des interessierenden Gens aus dem Schwellenwert-Zyklus (en: cycle threshold, ct) auf Basis der Schwellenwert-Analyse.

5 Prüfmaterialien

5.1 DNA

5.1.1 DNA, extrahiert aus reinen Bakterien- und Pilz-Isolaten unter Anwendung klassischer Extraktionsverfahren oder durch Verwendung eines handelsüblichen Kits zur Extraktion von genomischer DNA.

5.1.2 Boden-DNA, extrahiert aus Bodenteilproben nach ISO 11063.

5.2 Bakterien

5.2.1 Stamm von *Escherichia coli*, üblicherweise zum Klonieren des PCR-Produkts verwendet.

5.3 Plasmid

5.3.1 Klonierungsvektor, üblicherweise zum Klonieren des PCR-Produkts in kompetenten *Escherichia coli* verwendet.

5.4 Enzym

5.4.1 Taq-Polymerase.

5.4.2 T4-DNA-Ligase.

5.4.3 T4-Gen T32.

5.4.4 Rinderserumalbumin (CAS-Nr. 9048-46-8).

5.5 Chemikalien

5.5.1 Ampicillin-Natriumsalz, C₁₆H₁₈N₃NaO₄S (CAS-Nr. 69-52-3).

1) SYBR Green ist ein eingetragenes Warenzeichen von Molecular Probes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

2) TaqMan ist ein Warenzeichen von Roche Molecular Systems, Inc. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.