

DIN EN ISO 21569

ICS 67.050

Ersatz für
DIN EN ISO 21569:2005-09**Lebensmittel –****Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen
und ihren Produkten –****Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren (ISO 21569:2005 +
Amd 1:2013);****Deutsche Fassung EN ISO 21569:2005 + A1:2013**

Foodstuffs –

Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived
products –

Qualitative nucleic acid based methods (ISO 21569:2005 + Amd 1:2013);

German version EN ISO 21569:2005 + A1:2013

Produits alimentaires –

Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des
produits dérivés –Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques (ISO 21569:2005 +
Amd 1:2013);

Version allemande EN ISO 21569:2005 + A1:2013

Gesamtumfang 171 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21569:2005 + A1:2013) wurde vom SC 16 „Horizontal methods for molecular biomarker analysis“ des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe 11 „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ des Technischen Komitees CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) unter der Wiener Vereinbarung parallel erarbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der CEN/TC 275/WG 11 und im ISO/TC 34/SC 16 wird über den Arbeitsausschuss NA 057-01-04 AA „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Dieses Dokument enthält die Änderung A1, die von CEN am 2013-03-14 angenommen wurde.

Der Beginn und das Ende eines Textes, der durch die Änderung eingefügt oder geändert wurde, wird im Text durch die Markierungen **A1** **A1** angezeigt.

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

ISO 21571 siehe DIN EN ISO 21571

ISO 24276 siehe DIN EN ISO 24276

Änderungen:

Gegenüber DIN EN ISO 21569:2005-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Verweisung auf die geplante aber nicht erarbeitete EN ISO 21568 wurde gelöscht;
- b) die Verweisung auf die ISO 24276:2006 wurde aktualisiert;
- c) die Angaben zum qualitativen Ergebnis wurden klarer formuliert;
- d) die Angaben zur Qualitätssicherung in 9.4 wurden präzisiert;
- e) insgesamt wurden zehn neue Verfahren in die vier informativen Anhänge als A.5, A.6, B.6, B.7, B.8, B.9, C.6, C.7, C.8 und D.2 aufgenommen;
- f) das gesamte Dokument wurde redaktionell (Fußnoten) angeglichen;
- g) das Literaturverzeichnis wurde ergänzt.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 21569: 2005-09

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 21571 *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion*

DIN EN ISO 24276 *Lebensmittel — Auf Nukleinsäuren basierende Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Lebensmittel —
Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten
Organismen und ihren Produkten —
Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren
(ISO 21569:2005 + Amd 1:2013)

Foodstuffs —
Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products —
Qualitative nucleic acid based methods
(ISO 21569:2005 + Amd 1:2013)

Produits alimentaires —
Méthodes d'analyse pour la détection des organismes
génétiquement modifiés et des produits dérivés —
Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides
nucléiques (ISO 21569:2005 + Amd 1:2013)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 6. Juni 2005 angenommen und enthält die Änderung A1, die vom CEN am 14. März 2013 angenommen wurde.

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

Diese Änderung 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 des CEN-CENELEC 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, 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

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
A1 Vorwort der Änderung	5
Einleitung.....	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung des Verfahrens	7
5 Reagenzien	8
6 Prüfeinrichtungen	8
7 Verfahren	9
8 Auswertung	12
9 Angabe der Ergebnisse und Qualitätssicherung	12
10 Untersuchungsbericht	13
Anhang A (informativ) Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren.....	14
A.1 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Sojabohnen	14
A.2 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Multi-copy-DNA-Sequenzen, die in allen Pflanzenchloroplasten vorkommen	18
A.3 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches und GMO-Screening-Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Tomaten und/oder gentechnisch modifizierten Zeneca®-Tomaten stammt	22
A.4 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Mais	26
A.5 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt.....	30
A.6 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten	38
Anhang B (informativ) Screening-Verfahren	45
B.1 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor)	45
B.2 Alternatives Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor).....	49
B.3 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NOS-Terminator).....	53
B.4 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (<i>npt II</i> -Gen)	57
B.5 Screening-Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus gentechnisch modifizierten Tomaten stammt (Zeneca®-F282)	60
B.6 Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> nos-Terminator — <i>T-nos</i>)	61
B.7 Screening-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen (<i>FMV-34S</i> -Promotor)	69

B.8	Auf Real-time-PCR basierendes Screening-Verfahren zum Nachweis des <i>bar</i> -Gens von <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	78
B.9	Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln, die häufig in gentechnisch modifizierten Organismen verwendet werden und aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (CaMV-35S-Promotor, P35S) sowie aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (T-nos) stammen — Screening-Verfahren	87
Anhang C (informativ) Konstruktspezifische Verfahren		99
C.1	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifizierten GTS 40-3-2 (Roundup Ready®-Sojabohnen)	99
C.2	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifizierten Tomaten (Zeneca®-F282)	103
C.3	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem Bt 11-Mais	108
C.4	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem Event 176-Mais (Bt 176-Mais)	113
C.5	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem T 25-Mais	117
C.6	Konstruktspezifisches Verfahren zum qualitativen Nachweis von gentechnisch modifizierten DNA-Sequenzen in Papaya-Ring-Spot-Virus-resistenter Papaya (SunUp, Rainbow)	121
C.7	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus der gentechnisch modifizierten Reislinie TT51-1 (Sorte Bt63)	131
C.8	Konstruktspezifisches Verfahren zum Nachweis der <i>ctp2-cp4-epsps</i> -Sequenz zum Screening auf Bestandteile von gentechnisch modifizierten Organismen in Lebensmitteln ...	138
Anhang D (informativ) Ereignisspezifische Verfahren		148
D.1	Ereignisspezifisches Verfahren zum Nachweis modifizierter DNA-Sequenzen aus gentechnisch modifiziertem MON 810-Mais	148
D.2	Ereignisspezifisches Verfahren zum Nachweis der Rapslinie RT73	152
Literaturhinweise		162

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21569:2005) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2005 zurückgezogen werden.

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

Vorwort der Änderung

Dieses Dokument (EN ISO 21569:2005+Amd1:2013) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2013 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind 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, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21569:2005+Amd1:2013 wurde vom CEN als EN ISO 21569:2005+Amd1:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. 

Einleitung

Die Überprüfung von Zutaten auf gentechnische Modifikationen wird nach folgenden Schritten nacheinander (oder gleichzeitig) durchgeführt. Nach der Probenahme werden die Nukleinsäuren aus der Teilprobe extrahiert. Die extrahierten Nukleinsäuren können bei oder nach dem Extraktionsverfahren weiter gereinigt werden. Danach werden sie quantitativ bestimmt (falls erforderlich), verdünnt (falls erforderlich) und analytischen Verfahren (wie z. B. der Polymerase-Kettenreaktion [PCR]) unterzogen.

Diese Schritte werden ausführlich in der vorliegenden Internationalen Norm und in folgenden internationalen Normen mit dem allgemeinen Titel *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten* behandelt:

-  gestrichener Text 
- Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren (ISO 21570)
- Nukleinsäureextraktion (ISO 21571)

Weitere Angaben zu allgemeinen Gesichtspunkten und Definitionen zu allen oben angeführten Schritten sind zusammengefasst in ISO 24276.

Der qualitative Nachweis von DNA-Zielsequenzen (=Targetsequenzen) wird durchgeführt, um eine positive oder negative Antwort auf die Frage zu erhalten, ob eine bestimmte Zielsequenz, bezogen auf geeignete Kontrollen und innerhalb der Nachweisgrenzen des angewendeten analytischen Verfahrens und der untersuchten Teilprobe, nachgewiesen wurde oder nicht.

Die Spezifität der Verfahren, wie in den Anhängen A bis D beschrieben, reicht von Screening-Verfahren zum Nachweis gemeinsamer DNA-Sequenzen, die für GMOs charakteristisch sind, bis zur spezifischen Identifizierung eines Genkonstrukts oder eines bestimmten Transformationsereignisses.

Die Internationale Organisation für Normung (ISO) lenkt die Aufmerksamkeit auf den Sachverhalt, dass der Anspruch erhoben wird, dass die Einhaltung des vorliegenden Dokumentes mit der Anwendung eines Patentbesitzes über die PCR-Technologie verbunden sein kann.

ISO nimmt keine Stellung in Bezug auf Nachweis, Gültigkeit und Geltungsbereich dieses Patentrechtes.

ISO wurde darüber informiert, dass Applied Biosystems, Roche Molecular Systems Inc. und F. Hoffmann-La Roche Ltd. Halter von Patentrechten bezüglich der PCR-Technologie sind. Diese Firmen haben ISO zugesichert, dass sie bereit sind, über Lizenzen zu vernünftigen und nicht diskriminierenden Geschäftsbedingungen mit Antragstellern in der ganzen Welt zu verhandeln. In diesem Zusammenhang ist die Erklärung der Halter dieser Patentrechte bei ISO registriert. Informationen sind erhältlich bei:

Licensing Department

Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
USA

und

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
USA

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese vorstehend identifiziert wurden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm beschreibt das Verfahren zum qualitativen Nachweis gentechnisch modifizierter Organismen (GMOs) und ihrer Produkte durch Analyse der aus der zu untersuchenden Probe extrahierten Nukleinsäuren. Der Schwerpunkt dieser Norm sind Amplifikationsverfahren auf der Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Sie gibt allgemeine Anforderungen an den spezifischen Nachweis und die Identifizierung von Target-Nukleinsäuresequenzen (DNA) und an die Bestätigung der Identität der amplifizierten DNA-Sequenz.

In dieser Internationalen Norm angeführte Anleitungen, Mindestanforderungen und Leistungskriterien sind dafür vorgesehen, sicherzustellen, dass in verschiedenen Laboratorien vergleichbare, genaue und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

Diese Internationale Norm wurde für Lebensmittelmatrices erarbeitet, könnte jedoch auch auf andere Matrices angewendet werden (z. B. Futtermittel und aus der Umwelt entnommene Pflanzenproben).

Typische Beispiele der Verfahren sind in den Anhängen A bis D angegeben.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 21571:2005, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 24276.

4 Kurzbeschreibung des Verfahrens

4.1 Allgemeines

Die qualitative Analyse umfasst den spezifischen Nachweis von Target-Nukleinsäuresequenzen in der Untersuchungsprobe. Bei jedem Verfahren muss die Zielsequenz festgelegt sein.

Ein qualitatives Ergebnis muss eindeutig das Vorhandensein oder Fehlen des untersuchten genetischen Elements nachweisen, bezogen auf geeignete Kontrollen.

ANMERKUNG Nachweisgrenzen und Umfang der untersuchten Einwaage sind kritische Aspekte eines Verfahrens.

4.2 PCR-Amplifikation

Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgt *in vitro* durch eine Reaktion, die von einer DNA-Polymerase in Gegenwart von Oligonukleotid-Primern und Desoxyribonukleosid-Triphosphaten in einer festgelegten Reaktionspufferlösung [1], [2] katalysiert wird. Eine entscheidende Voraussetzung für die Amplifikation der Zielsequenz ist, dass das Reaktionsgemisch keine Polymerase-Inhibitoren enthält. Die Amplifikation der DNA ist ein zyklischer Prozess, der Folgendes umfasst:

- Auftrennen (Denaturieren) der Doppelstrang-DNA zur Einzelstrang-Nukleinsäure durch Erwärmen;
- Anlagerung (Annealing) der Primer an die Zielsequenz bei einer geeigneten Temperatur, und
- Verlängerung (Elongation) der Primer, die an beide Einzelstränge gebunden sind, durch eine für PCR geeignete DNA-Polymerase bei einer geeigneten Temperatur.

4.3 Nachweis und Bestätigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte werden durch Gel-Elektrophorese oder ein geeignetes alternatives Verfahren nachgewiesen, gegebenenfalls nach Isolierung durch ein geeignetes Trennverfahren.

Die Identität einer beliebigen nachgewiesenen Zielsequenz kann durch ein geeignetes Verfahren, z. B. durch Restriktionsenzymanalyse, Hybridisierung oder DNA-Sequenzanalyse, verifiziert werden.

Bei Real Time-PCR-Analysen erfolgen Amplifikation und Nachweis gleichzeitig.

5 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, ist es im Allgemeinen ratsam, die für das Analysenverfahren notwendigen Reaktionslösungen bei etwa – 20 °C aufzubewahren.

Es wird auch empfohlen, die für das Analysenverfahren notwendigen Reaktionslösungen zu aliquotieren, um zu vermeiden, dass die Lösungen einem wiederholten Wechsel von Gefrieren und Auftauen ausgesetzt werden, und/oder um die Wahrscheinlichkeit von Kontaminationen zu verringern.

5.1 Target-DNA/Kontrolle

5.2 Wasser

5.3 Desoxyribonukleosid-Triphosphat (dNTP)-Lösung, die dATP, dCTP, dGTP und dTTP oder dUTP enthält

ANMERKUNG Die Verwendung von dUTP kann sich störend auf die Restriktionsenzymanalyse von PCR-Produkten auswirken.

5.4 PCR-Pufferlösung

Die PCR-Pufferlösung wird gewöhnlich zusammen mit der DNA-Polymerase geliefert und kann $MgCl_2$ in Konzentrationen, die von Hersteller festgelegt sind, enthalten, braucht aber nicht. Die endgültigen Konzentrationen von $MgCl_2$ sind verfahrensspezifisch und deshalb im jeweiligen Anhang angeführt. Gebrauchsfertige Reagenzien sind möglicherweise im Handel erhältlich. Die Gebrauchsanweisungen des Herstellers sollten berücksichtigt werden.

5.5 Thermostabile DNA-Polymerase

5.6 Forward Primer

5.7 Reverse Primer

6 Prüfeinrichtungen

Zu Details, siehe ISO 24276 und die Anhänge A bis D.

7 Verfahren

7.1 Qualität, Unversehrtheit und Amplifizierbarkeit von Nukleinsäureextrakten

Die Nukleinsäure-Lösung muss für die anschließende Analyse ausreichend rein sein [3]. Die Qualität und die Menge von Nukleinsäure, die unter Anwendung eines gegebenen Verfahrens aus einer gegebenen Matrix extrahiert wurde, muss wiederholbar und reproduzierbar sein.

ANMERKUNG Die Qualität, Unversehrtheit und Menge an DNA beeinflussen das Ergebnis der PCR und folglich die erhaltenen Analysenergebnisse. Die Nachweisgrenze eines bestimmten Verfahrens kann demzufolge davon abhängen, ob das Untersuchungsgut verarbeitet oder raffiniert wurde, und vom Grad der Zersetzung (Degradierung) der DNA im Untersuchungsgut.

Nukleinsäuren für die Anwendung in der PCR sollten im Wesentlichen frei von PCR-Inhibitoren [4] sein. PCR-Inhibitionskontrollen sind wie in ISO 24276 beschrieben einzubeziehen.

7.2 Leistungskriterien

Die allgemeinen Leistungskriterien sind in ISO 24276 beschrieben.

Die Werte für die Leistungsmerkmale sind für jedes in den Anhängen A bis D aufgeführte Verfahren angegeben und sollten die Genomgrößen berücksichtigen, siehe [5].

Die Reaktionsbedingungen, besonders die $MgCl_2$ -Konzentration und die Einstellwerte des Thermocyclers, sollten für jedes Primerpaar und/oder -system optimiert werden. Wenn ein Primersystem das erste Mal angewendet wird, ist es notwendig, im Voraus nachzuweisen, dass die für die bestimmte zu untersuchende Matrix ausgewählten Zyklusbedingungen unerwünschte konkurrierende Produkte verhindern, die sonst die Empfindlichkeit der PCR-Detektion verringern würden.

Bei einer optimalen Reaktion sind weniger als 40 Zyklen erforderlich, um ≥ 10 Target-Moleküle zu amplifizieren und damit ein Produkt zu erhalten, das mit genormten Verfahren zuverlässig nachweisbar ist. Wenn die Anzahl der Zyklen erhöht wird, können die unspezifischen Produkte zunehmen. Die optimierte PCR sollte in der Lage sein, in 40 PCR-Zyklen von einer reinen Referenzprobe mit 100 Kopien an Matrizen-DNA ausreichend Kopien des PCR-Produktes zu vervielfältigen, damit es nachweisbar wird. Das charakteristische Temperatur-Zeit-Profil für jedes Primersystem, das für die angewendete Apparatur geeignete Reaktionsgemisch und die Anzahl der Zyklen sind streng einzuhalten.

Im Allgemeinen sollte die Spezifität der Reaktion so weit wie möglich erhöht werden (z. B. durch Anwendung von hot-start-PCR). Als Verfahren zur Verringerung der Nebenreaktionen, wie z. B. die Amplifikation von Sequenzen in der Hintergrund-DNA, die keine Targetsequenzen sind, (falsche Anlagerung des Primers, en: mispriming) und Oligomerisierung der Primer, wird hot-start-PCR empfohlen (so wird die Spezifität erhöht).

Die aus der Validierungsuntersuchung stammenden Werte gelten möglicherweise nicht für andere Konzentrationsbereiche des Analyten und andere Matrices als in den betreffenden Anhängen angegeben.

7.3 Aspekte bei der Durchführung der PCR

7.3.1 Allgemeines

Weil das Leistungsverhalten jeder spezifischen PCR mit anderen spezifischen PCRs vergleichbar sein sollte, sind folgende Aspekte bei der Durchführung der PCR zu berücksichtigen.

7.3.2 Größe von PCR-Produkten

Die Größe der Targetsequenz sollte so ausgewählt werden, dass sie im Bereich der relativen Molekülmasse liegt, der im zu analysierenden Nukleinsäureextrakt vorliegt.

BEISPIEL Bei stark denaturierter DNA aus verarbeiteten Lebensmitteln liegt die Größe des PCR-Produktes idealerweise im Bereich 60 bp bis 150 bp. Bei unverarbeitetem Untersuchungsgut ist ein breiterer Bereich von PCR-Produkten, z. B. bis zu 250 bp, anwendbar.

Wenn jedoch Vorversuche zur Bestimmung der Gültigkeit von Primer-Sets durchgeführt werden, die zu PCR-Produkten von unterschiedlicher Größe führen, können diese bei der Matrix angewendet werden, für die sie validiert wurden.

7.3.3 Primer

7.3.3.1 Allgemeines

Informationen über Primersequenzen sind in den Anhängen A bis D enthalten.

7.3.3.2 Primeraufbau

Wenn praktisch durchführbar, sollten die Primer-Sequenzen vorzugsweise die folgenden Merkmale haben:

- Länge eines Primers: 18 Nukleotide bis 30 Nukleotide;
- optimale Annealing-Temperatur $\approx 60\text{ °C}$ (sollte experimentell bestimmt werden), d. h. geschätzte Schmelztemperatur $\leq 65\text{ °C}$;
- Verhältnis von GC : AT = 50 : 50, wenn möglich, sonst möglichst nah an diesem Verhältnis;
- hohe innere Stabilität; (Eine Konzentrierung von Gs und Cs in kurzen Segmenten von Primern ist zu vermeiden)
- minimale Komplementarität des 3'-Endes, um die Bildung von Primer-Dimeren zu vermeiden;
- minimale Sekundärstruktur;
- minimale Dimerbildung mit spezifischen Nachweissonden, die für die PCR ausgelegt sind.

Zur Unterstützung bei der Bestimmung des Primeraufbaus stehen Software-Pakete zur Verfügung.

7.3.3.3 Validierung von Primern

7.3.3.3.1 Allgemeines

Die Eignung von Primern zum Nachweis der Targetsequenz muss validiert sein.

Die Validierung der Primer sollte in zwei Schritten erfolgen: zuerst eine theoretische Bewertung, dann eine experimentelle Bewertung.

7.3.3.3.2 Theoretische Bewertung der Spezifität

Eine theoretische Bewertung bedeutet, dass mindestens eine Überprüfung auf gleichartige Sequenzen (z. B. FastA, Blast^{® 1)}) im Vergleich zu einer der großen Nukleinsäuresequenz-Datenbanken (z. B. EMBL, GenBank^{® 1)}) erfolgen muss. Homologe Gensequenzen können in Sequenz-Datenbanken gefunden und systematisch verglichen werden (aligned), um die Chance abschätzen zu können, dass ähnliche Sequenzen in der taxonomischen Zielgruppe oder anderen Organismen zu finden sind.

1) Blast und Genbank sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

7.3.3.3 Experimentelle Bewertung der Spezifität

Ungeachtet der angewendeten Kriterien für den Aufbau muss die Spezifität der Primer immer experimentell bewertet werden, um die Fähigkeit des Primers, zwischen den Target- und nahe verwandten Nicht-Zielsequenzen (Non-Targetsequenzen) zu unterscheiden, zu bestätigen.

Bei Primern, die für den Nachweis taxonspezifischer Targetsequenzen ausgelegt sind, sollte nachgewiesen sein, dass der Nachweis dieser Sequenzen in einer $\langle A_1 \rangle$ angemessenen $\langle A_1 \rangle$ Anzahl unterschiedlicher Mitglieder der taxonomischen Gruppe zuverlässig erfolgt.

7.4 Beschreibungen von PCR-Targets

Je nach Art der untersuchten Matrices und/oder den Anforderungen der Analyse können zum qualitativen Nachweis und zur Identifizierung von GMOs verschiedenartige PCR-Prüfungen durchgeführt werden. Diese Analysen können auf Sequenzen, die für taxonomische Zielgruppen spezifisch sind, Genkonstrukte und Transformationsereignisse sowie auf Elemente, die für Screening-Zwecke geeignet sind, ausgerichtet sein.

7.5 Kontrollen

Da das Risiko besteht, falsch positive und/oder falsch negative Ergebnisse zu erhalten, müssen geeignete Kontrollen in jedes Diagnose-PCR-Assay einbezogen werden (siehe ISO 24276).

Wenn sie zur Verfügung stehen und geeignet sind, sollten zertifizierte Referenzmaterialien als positive und negative Kontrollen Anwendung finden.

7.6 PCR-Ansatz, Nachweis und Bestätigung von PCR-Produkten

Einzelheiten zu den spezifischen PCR-Verfahrensschritten stehen in den Anhänge A bis D.

ANMERKUNG Im Fall des Nachweises von PCR-Produkten durch Gelelektrophorese kann die Größe des PCR-Produktes mit einem geeigneten DNA-Größenmarker von bekannter Länge abgeschätzt werden, der parallel mit den zu untersuchenden PCR-Produkten läuft.

In einigen Fällen ist es möglicherweise wünschenswert, ein positives oder negatives Ergebnis hinsichtlich einer einzelnen gentechnischen Modifikation zu bestätigen. Das kann erreicht werden, indem Primer zu einer anderen Targetsequenz verwendet werden, das ist besonders für die Bestätigung von Prüfergebnissen eines Screenings geeignet.

Eine positive Identifizierung von spezifischer Target-DNA-Sequenz darf durch ein geeignetes, sich von der Bestimmung der Größe des PCR-Produktes unterscheidendes, Verfahren bestätigt werden, z. B. durch:

- Hybridisierung des PCR-Produktes mit spezifischen Sonden oder
- Durchführung von Restriktionsanalysen des PCR-Produktes: Die Länge der sich ergebenden Fragmente muss der erwarteten Länge des Target-DNA-Sequenz nach der Restriktion entsprechen oder
- Sequenzierung des PCR-Produktes oder
- eine andere gleichwertige Bestätigung.

Wenn die verwendeten Primer für den Nachweis von Sequenzen ausgelegt sind, die von infektiösen Organismen stammen (ein natürlich vorkommender, nicht gentechnisch modifizierter Organismus, wie z. B. ein Virus oder ein Bakterium), dann ist sehr zu empfehlen, dass sichergestellt ist, dass die nachgewiesene DNA tatsächlich vom GMO stammt. Das kann durch Überprüfungen des Fehlens anderer DNA erfolgen, die vom infektiösen Organismus stammt.

BEISPIEL Der 35S-Promotor stammt aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV) und folglich könnte der CaMV-35S-Promotor durch das Vorliegen von DNA nachgewiesen werden, die entweder aus dem GMO und/oder dem CaMV stammt [6]. Bei der Überprüfung auf das Vorliegen weiterer, aus dem CaMV stammender, DNA ist es möglich, die GMO-Herkunft des CaMV-35S-Promotors zu bestätigen, wenn keine weitere vom CaMV stammende DNA nachgewiesen werden konnte.

8 Auswertung

8.1 Allgemeines

Das PCR-Ergebnis ist entweder

- a) positiv, wenn ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen wurde und sämtliche Kontrollen zu Ergebnissen geführt haben, wie sie in Tabelle 2 von ISO 24276 [A1]:2006 [A1] festgelegt sind, oder
- b) negativ, wenn kein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen wurde und sämtliche Kontrollen zu Ergebnissen geführt haben, wie sie in Tabelle 2 von ISO 24276 [A1]:2006 [A1] festgelegt sind.

ANMERKUNG Ereignisspezifische Zielsequenzen können manchmal zusammen mit weiteren ereignisspezifischen Sequenzen in einem einzelnen GMO vorliegen, (z. B. durch Ansammlung von Transgenen ["gene stacking"]) [7].

Wenn die Ergebnisse nicht eindeutig sind, muss das Verfahren wiederholt werden, siehe ISO 24276.

8.2 Verifizierung

Die Verifizierung von positiven oder negativen Ergebnissen in Bezug auf Zielsequenzen darf wie in 7.6 beschrieben durchgeführt werden.

9 Angabe der Ergebnisse und Qualitätssicherung

9.1 Allgemeines

Die Ergebnisse müssen eindeutig angegeben werden, d. h. nicht in Form von „+/-“.

Ein negatives Ergebnis darf nie als „GMO nicht vorhanden“ angegeben werden.

Im Idealfall sollte die Bestimmungsgrenze (Limit of detection [LOD]) in Bezug auf die Untersuchungsprobe angegeben werden. Das erfordert jedoch besondere Materialien, DNA von außergewöhnlich hoher Qualität und/oder die Anwendung von anspruchsvoller Laborausrüstung, die nicht allen Laboratorien zur Verfügung steht. Als Folge davon kann die Analyse sehr arbeitsintensiv und/oder teuer werden und deshalb ist das für Routinezwecke praktisch nicht anwendbar.

Die LOD ist mindestens in Bezug auf ein Referenzmaterial anzugeben und als ein relativer Wert, der auf einer bestimmten Matrix basiert (vorzugsweise eine gegebene Menge einer genomischen DNA-Lösung, z. B. 100 ng von 0,01 % GTS 40-3-2-DNA).

9.2 Angabe eines negativen Ergebnisses

Der folgende Text muss im Untersuchungsbericht erscheinen:

„Bei der Probe X wurde keine Zielsequenz Y nachgewiesen.

Die LOD des Verfahrens ist x %, bestimmt mit ABC (Angaben zum Referenzmaterial).“

Wenn nicht nachgewiesen werden kann, dass die Menge an Target-DNA, die bei der PCR enthalten ist, ausreichend ist, damit die LOD angewendet werden kann, muss der folgende Satz hinzugefügt werden:

„Die Menge der aus der Art X extrahierten Target-DNA war jedoch möglicherweise/war jedoch ungenügend, um die LOD auf diese Probe anwenden zu können.“

ANMERKUNG Die LOD der Probe wird bestimmt durch die Menge an DNA der Art, die in die Analysenreaktion einbezogen wird (Anzahl der Kopien) und das Verhältnis der absoluten LOD des GM-Targets (Anzahl der Kopien) zu der Kopienzahl der erstgenannten DNA [7].

9.3 Angabe eines positiven Ergebnisses

Der folgende Text muss im Untersuchungsbericht erscheinen:

„Bei der Probe X wurde die Zielsequenz Y nachgewiesen.“

Die Identität des GMO kann einbezogen werden, falls sie verfügbar ist.

9.4 Anforderungen an die Qualitätssicherung

A1 Die Ergebnisse von derselben Einwaage müssen widerspruchsfrei sein. Wenn die Ergebnisse für die beiden Wiederholungsbestimmungen „+/-“ lauten, müssen die beiden PCR für die entsprechende Einwaage wiederholt werden. Wenn die beiden neuen Wiederholungsbestimmungen bei der Untersuchung „+/-“ oder „-/-“ ergeben, wird die Einwaage als negativ angesehen.

Die Ergebnisse aller Einwaagen müssen widerspruchsfrei sein. Wenn mindestens eine Einwaage zu einem positiven Ergebnis und mindestens eine andere zu einem negativen Ergebnis führt, muss die Analyse wiederholt werden.

Wenn mindestens eine Wiederholung des Verfahrens, beginnend mit der Nukleinsäureextraktion, zu Ergebnissen führt, die nicht eindeutig sind, wie z. B. zu einem positiven und einem negativen Ergebnis, sollte im Untersuchungsbericht angegeben werden, dass die Probe bei der Nachweisgrenze LOD negativ ist. **A1**

10 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss nach ISO 24276 erstellt werden und mindestens die folgenden zusätzlichen Angaben enthalten:

- die Nachweisgrenze und die zur Feststellung der Nachweisgrenze verwendete Matrix;
- **A1** die Spezifität des Analysenverfahrens (ereignisspezifisches, konstruktsspezifisches oder Screening-Verfahren); **A1**
- das Ergebnis, wie in Abschnitt 9 angegeben.

Anhang A (informativ)

Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren

A.1 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Sojabohnen

A.1.1 Anwendungsbereich

Dies ist ein Routineverfahren zum Nachweis eines artspezifischen Single-copy-Gens, das in Sojabohnen (*Glycine max*) vorkommt.

Dieses Verfahren darf zur Beurteilung der Amplifizierbarkeit der DNA von aus Sojabohnen hergestellten Produkten angewendet werden.

A.1.2 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.1.2.1 Ringversuch

Dieses Verfahren wurde in Ringversuchen [8], [9] validiert, die von der Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zum Nachweis mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschlands nach § 35 des LMBG organisiert wurde. Für die DNA-Extraktion wurde das in ISO 21571:2005, A.3, angeführte CTAB-Verfahren (jedoch mit einer Teilprobe von 100 mg) angewendet.

Die Daten der Ringversuche sind in Tabelle A.1 angegeben.

Tabelle A.1 — Ergebnisse der Ringversuche

Jahr des Ringversuches	1997 [8]	1998/1999 [9]
Anzahl der Laboratorien	25	27
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	22	20
Anzahl der Proben je Laboratorium	10	3
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	220	60
Anzahl der Proben, die Soja enthalten	220	50
Falsch positive Ergebnisse	0	1 (2 %)
Falsch negative Ergebnisse	0	1 (2 %)

A.1.2.2 Molekulare Spezifität

A.1.2.2.1 Allgemeines

Dieser Anhang erfüllt die in Abschnitt 7 angeführten Anforderungen.

Dieses Verfahren wurde für eine Zielsequenz entwickelt, die unter der GenBank®²⁾ Eintrag-Nummer K00821 = M30884 beschrieben ist.

A.1.2.2.2 Theoretisch

Das aus Gen-Datenbanken erhaltene Soja-Lektin-Gen *Le1* [10] wurde als Zielsequenz ausgewählt.

Es wurde keine Ähnlichkeit der Sequenzen mit DNA-Sequenzen anderer Kulturpflanzen (Hülsenfrüchte, Getreide, Gemüse) festgestellt (NCBI BlastN®²⁾ Recherche, European Molecular Biology Laboratory (EMBL)-Datenbank, 28. September 2001). GM03 stimmt jedoch zu 100 % mit den Sequenzen in den folgenden Datenbankeinträgen überein: AX033509 (Sequenz 17 vom Patent DE19906169), AX033507 (Sequenz 15 vom Patent DE19906169) und AX033501 (Sequenz 9 vom Patent DE19906169), während GM04 nur mit Eintrag Nr. AX033509 (Sequenz 17 vom Patent DE19906169) übereinstimmt. Es ist anzumerken, dass die Eintrag-Nummer M30884 dieselbe ist wie K00821, ein GenBank® Eintrag, der ursprünglich 1993 angemeldet wurde.

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz wurde nicht bestimmt, es wird jedoch vermutet, dass es sich um ein Single-copy-Gen handelt.

A.1.2.2.3 Experimentell

Bei der Verwendung von DNA aus anderen Kulturpflanzen (Hülsenfrüchte, Getreide, Gemüse) und aus Rind- und Schweinefleisch wurde keine Amplifikation festgestellt. Das Sojabohnen-PCR-Assay erweist sich als sehr spezifisch für Sojabohnen-DNA [10], [11].

A.1.2.3 Nachweisgrenze (LOD)

Die absolute LOD wurde nicht bestimmt, es wurde jedoch nachgewiesen, dass mit dem Verfahren mindestens 0,1 ng Sojabohnen-DNA fluorimetrisch nachgewiesen werden können.

A.1.3 Anpassung

Es sind keine besonderen Angaben vorhanden.

A.1.4 Kurzbeschreibung

Ein 118-bp-Fragment des Soja-Lektin-Gens wird durch PCR amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

A.1.5 Reagenzien

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 24276.

A.1.5.1 Wasser

A.1.5.2 PCR-Pufferlösung (ohne MgCl_2), $10\times^3$) (10-fach)

A.1.5.3 MgCl_2 -Lösung, $c(\text{MgCl}_2) = 25 \text{ mmol/l}$

2) Blast und Genbank sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

3) $10\times$ bedeutet 10-fach, d. h. eine PCR-Pufferlösung, die 1,5 mol/l Tris-HCl enthält, mit einem pH-Wert von 8,3.

A.1.5.4 dNTP-Lösung, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (von jedem)

A.1.5.5 Oligonukleotide

A.1.5.5.1 Forward Primer

Soja-Lektin-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer K00821)

Primer GM03: 5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'

A.1.5.5.2 Reverse Primer

Soja-Lektin-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer K00821)

Primer GM04: 5'-gCC CAT CTg CAA gCC TTT TTg Tg-3'

A.1.5.6 Thermostabile DNA-Polymerase (für hot-start-PCR), 5 IU/ μl

A.1.5.7 Hybridisierungssonde (GM)

5'-ggT AgC gTT gCC AgC TTC g-3'

A.1.5.8 Natriumchlorid-Natriumcitrat-Pufferlösung (SSC) 5-fach, pH-Wert 7,0

Eine fünffach konzentrierte SSC ist eine Lösung, die 0,75 mol/l NaCl und 0,075 mol/l Natriumcitrat enthält.

A.1.5.9 Prähybridisierungslösung

Enthält 5-fach konzentrierte SSC, 0,1 % (Massenvolumenkonzentration) N-Lauroylsarcosin, 0,02 % (Massenvolumenkonzentration) Natriumdodecylsulfat (SDS) und 1 % Blockingreagenz⁴⁾ oder 5 % (Massenvolumenkonzentration) Magermilchpulver [12].

A.1.5.10 Hybridisierungslösung

Enthält 10 pmol der Hybridisierungssonde in 2,5 ml Prähybridisierungslösung (A.1.5.9). Die Hybridisierungstemperatur ist 50 °C. Weitere Angaben zu den Hybridisierungsbedingungen sind in [12] anführt.

A.1.6 Prüfeinrichtung

A.1.6.1 Thermocycler

A.1.6.2 Elektrophoresekammer, mit Netzanschluss

A.1.7 Durchführung

A.1.7.1 PCR-Ansatz

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen je PCR-Ansatz von 25 μl mit den in Tabelle A.2 angegebenen Reagenzien. Die PCR kann auch in einem größeren Volumen durchgeführt werden, wenn die Lösungen entsprechend angepasst werden. Die in Tabelle A.2 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

4) Blockingreagenz ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt, das bei Boehringer, Mannheim bezogen werden kann. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Tabelle A.2 — Zugabe von Reagenzien

Reagenz	Endkonzentration	Volumen je Probe μl
DNA-Probe	10 ng bis 50 ng	1
Wasser		15,9
10-fache PCR-Pufferlösung (ohne MgCl_2)	1fach	2,5
MgCl_2 -Lösung ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
dNTP-Lösung, 10 mmol/l	0,8 mmol/l	2
Primer GM03, 5 $\mu\text{mol/l}$	0,2 $\mu\text{mol/l}$	1
Primer GM04, 5 $\mu\text{mol/l}$	0,2 $\mu\text{mol/l}$	1
Taq-DNA-Polymerase, 5 IU/ μl	0,5 IU	0,1
^a Falls die PCR-Pufferlösung schon MgCl_2 enthält, wird die Endkonzentration an MgCl_2 im Reaktionsgemisch auf 1,5 mmol/l eingestellt.		

A.1.7.2 PCR-Kontrollen

Als positive Kontrolle können zertifizierte Referenzmaterialien von GTS 40-3-2, hergestellt vom Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) Geel, Belgien (IRMM-410), verwendet werden.

Alle weiteren geeigneten Kontrollen sollten wie in ISO 24276 beschrieben einbezogen werden.

A.1.7.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle A.3 angegebene Temperatur-Zeit-Programm wurde bei der Validierungsuntersuchung angewendet, wobei die Thermocycler GeneAmp® 2400 oder GeneAmp® 9600 und AmpliTaq Gold®-DNA-Polymerase⁵⁾ eingesetzt wurden. Bei der Anwendung anderer Thermocycler kann eine Anpassung erforderlich sein. Die Zeit für die Aktivierung/initiale Denaturierung hängt von der verwendeten Polymerase ab. Falls eine hot-start-Polymerase verwendet wird, sollten die Empfehlungen des Herstellers eingehalten werden, sofern in der Vorschrift nicht anderes festgelegt ist.

Tabelle A.3 — Temperatur-Zeit-Programm

Aktivierung/initiale Denaturierung	10 min/95 °C
Amplifikation	30 s/95 °C
	30 s/60 °C
	60 s/72 °C
Anzahl der Zyklen	35
Abschließende Elongation	3 min/72 °C

- 5) GeneAmp® 2400 und 9600 sowie AmpliTaq Gold®-DNA-Polymerase sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte, die bei Applied Biosystems, vormals Perkin Elmer/Applied Biosystems, bezogen werden können. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

A.1.8 Identifizierung

Da dieses Verfahren nur als ein Kontrollverfahren zur Bestimmung der Qualität der extrahierten DNA festgelegt ist, basiert die Identifizierung nur auf der Größe des PCR-Produktes.

Wenn das Verfahren zu anderen Zwecken als vorstehend angeführt genutzt wird, darf die Identität des amplifizierten Produktes durch Southern-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Oligonukleotid-Sonde GM (A.1.5.7 bis A.1.5.10) oder durch Sequenzierung des PCR-Produktes und Vergleich mit den in A.1.5.5. angegebenen GenBank®-Einträgen nachgewiesen werden.

A.1.9 Allgemeine Qualitätssicherung und Auswertung der Ergebnisse

Es wird angenommen, dass die Zielsequenz nachgewiesen ist, wenn die Größe des PCR-Produktes der erwarteten Länge der Target-DNA-Sequenz entspricht, bestimmt durch Vergleich mit Produkten, die aus zertifiziertem Referenzmaterial abgeleitet wurden, das aus GTS 40-3-2 (z. B. IRMM-410-Reihe von IRMM, Geel, Belgien) hergestellt wurde.

Hinsichtlich der Identifizierungszwecke siehe A.1.8.

Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 118 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA aus Sojabohnen innerhalb der in A.1.2.2 beschriebenen abgeschätzten Spezifitätsbeschränkungen enthält.

Zu Einzelheiten der elektrophoretischen Verfahrensschritte, siehe ISO 21571:2005, B.2.

A.2 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Multi-copy-DNA-Sequenzen, die in allen Pflanzenchloroplasten vorkommen

A.2.1 Allgemeines

Dies ist ein Routineverfahren zum Nachweis von Multi-copy-DNA-Sequenzen, die in allen Pflanzenchloroplasten vorkommen (das Chloroplast-trnL-Intron).

Mit diesem Verfahren kann überprüft werden, ob die DNA-Extraktion einer Lebensmittelprobe erfolgreich war und ob die Probe amplifizierbare pflanzliche DNA enthält. Bei verarbeitetem Untersuchungsgut hängt die Anwendbarkeit des Verfahrens vom Grad der Degradierung der DNA ab.

Eine Pflanzenzelle enthält normalerweise ein Vielfaches an Kopien von dieser DNA-Sequenz und die Größe der Target-DNA-Sequenz ist wesentlich länger als die DNA-Sequenzen, die zum Nachweis von spezifischen gentechnischen Modifikationen verwendet werden. Deshalb kann dieses Verfahren nicht als Kontrolle zum Zweck der quantitativen Bestimmung angewendet werden.

Die Anzahl der Kopien je Zelle kann sich in Abhängigkeit von Pflanzenart und Gewebe unterscheiden.

A.2.2 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.2.2.1 Ringversuch

Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch [13] validiert, der von der Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zum Nachweis mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschlands nach § 35 des LMBG organisiert wurde. Für die DNA-Extraktion wurde das in ISO 21571:2005, A.3, angeführte CTAB-Verfahren angewendet (jedoch mit einer Teilprobe von 100 mg).

Die Daten des Ringversuchs sind in Tabelle A.4 angegeben.

Tabelle A.4 — Ergebnisse des Ringversuchs

Jahr	1995
Anzahl der Laboratorien	18
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	18
Anzahl der Proben je Laboratorium	10
Gesamtanzahl der Proben	180
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	180
Anzahl der Proben, die B33-INV-Kartoffel enthalten	71
Anzahl der Proben, die keine GM-Kartoffel enthalten	109
Falsch positive Ergebnisse	0 (0 %)
Falsch negative Ergebnisse	0 (0 %)

A.2.2.2 Molekulare Spezifität

A.2.2.2.1 Allgemeines

Dieser Anhang erfüllt die in Abschnitt 7 angeführten Anforderungen.

Dieses Verfahren wurde für Zielsequenzen entwickelt, die in [14] beschrieben sind, d. h. unter der GenBank® Eintrag-Nummer Z00044, S54304, X15901.

A.2.2.2.2 Theoretisch

Bei Datenbankrecherchen (NCBI BlastN® Recherche, EMBL-Datenbank, 28. September 2001) wurde keine wesentliche Ähnlichkeit mit DNA-Sequenzen von Organismen, die keine Pflanzen sind, festgestellt.

Die Primer wurden so ausgewählt, dass eine für Chloroplasten-DNA eindeutige Sequenz amplifiziert wird (das Intron, das das trnL-Gen unterbricht) und dass sie keine bekannte Ähnlichkeit mit Nicht-Zielsequenzen aufweisen.

A.2.2.2.3 Experimentell

Bei der Verwendung von DNA aus Tieren, Pilzen oder Bakterien wurde keine Amplifikation festgestellt [14].

Eine Amplifikation wurde bei der Verwendung von DNA aus Algen, Cyanobakterien, Moosen (Bryophyta), Farnen (Pteridophyta), Nacktsamern (Gymnospermen) und Bedecktsamern (Angiospermen) nachgewiesen [14].

Die Anzahl der Kopien von Zielsequenzen ist ein Vielfaches, in Abhängigkeit von Pflanzenart und Gewebetyp.

A.2.2.3 Nachweisgrenze (LOD)

Die absolute Nachweisgrenze wurde nicht bestimmt, es wurde jedoch nachgewiesen, dass mit dem Verfahren mindestens 0,1 ng Sojabohnen-DNA, fluorimetrisch bestimmt, nachgewiesen werden können.

A.2.3 Anpassung

Es sind keine besonderen Angaben vorhanden.

A.2.4 Kurzbeschreibung

Ein DNA-Fragment von 500 bp bis 600 bp, das im tRNA-Gen von Chloroplasten vorkommt [14], wird durch PCR amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

A.2.5 Reagenzien

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 24276.

A.2.5.1 Wasser

A.2.5.2 PCR-Pufferlösung (ohne MgCl_2), 10-fach

A.2.5.3 MgCl_2 -Lösung, $c(\text{MgCl}_2) = 25 \text{ mmol/l}$

A.2.5.4 dNTP-Lösung, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (von jedem)

A.2.5.5 Oligonukleotide

A.2.5.5.1 Forward Primer

Chloroplasten-tRNA-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer Z00044, X15901)

Primer c [14]: 5'–CgA AAT Cgg TAg ACg CTA Cg-3'

A.2.5.5.2 Reverse Primer

Chloroplasten-tRNA-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer Z00044, X15901)

Primer d [14]: 5'–ggg gAT AgA ggg ACT TgA AC-3'

A.2.5.6 Thermostabile DNA-Polymerase, 5 IU/ μl

A.2.6 Prüfeinrichtung

Nach A.1.6.

A.2.7 Durchführung

A.2.7.1 PCR-Ansatz

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen je PCR-Ansatz von 25 μl mit den in Tabelle A.5 angegebenen Reagenzien. Die PCR kann auch in einem größeren Volumen durchgeführt werden, wenn die Lösungen entsprechend angepasst werden. Die in Tabelle A.5 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

Tabelle A.5 — Zugabe von Reagenzien

Reagenz	Endkonzentration	Volumen je Probe μl
DNA-Probe	10 ng bis 50 ng	1
Wasser		13,9
10-fache PCR-Pufferlösung (ohne MgCl_2)	1fach	2,5
MgCl_2 -Lösung ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
dNTP-Lösung, 10 mmol/l	0,8 mmol/l	2
Primer c, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,8 $\mu\text{mol/l}$	2
Primer d, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,8 $\mu\text{mol/l}$	2
Taq-DNA-Polymerase, 5 IU/ μl	0,5 IU	0,1

^a Falls die PCR-Pufferlösung schon MgCl_2 enthält, wird die Endkonzentration an MgCl_2 im Reaktionsgemisch auf 1,5 mmol/l eingestellt.

A.2.7.2 PCR-Kontrollen

Als positive Kontrolle können zertifizierte Referenzmaterialien von GTS 40-3-2, hergestellt vom Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) Geel, Belgien (IRMM-410), verwendet werden.

Alle weiteren geeigneten Kontrollen sollten wie in ISO 24276 beschrieben einbezogen werden.

A.2.7.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle A.6 angegebene Temperatur-Zeit-Programm wurde bei der Validierungsuntersuchung angewendet, wobei die Thermocycler GeneAmp® 2400 oder GeneAmp® 9600 und AmpliTaq®-DNA-Polymerase⁶⁾ eingesetzt wurden. Bei der Anwendung anderer Thermocycler kann eine Anpassung erforderlich sein. Die Zeit für die Aktivierung/initiale Denaturierung hängt von der verwendeten Polymerase ab. Falls eine hot-start-Polymerase verwendet wird, sollten die Empfehlungen des Herstellers eingehalten werden, sofern in der Vorschrift nicht anderes festgelegt ist.

Tabelle A.6 — Temperatur-Zeit-Programm

Aktivierung/initiale Denaturierung	4 min/94 °C
Amplifikation	30 s/95 °C
	30 s/55 °C
	120 s/72 °C
Anzahl der Zyklen	35
Abschließende Elongation	5 min/72 °C

A.2.8 Identifizierung

Die genaue Größe des Fragmentes ist für dieses Verfahren nicht von Bedeutung, weil dieses Verfahren nur als ein Kontrollverfahren zur Bestimmung der Qualität der extrahierten DNA festgelegt ist. Bis jetzt basiert die Identifizierung nur auf einer Größe des PCR-Produktes innerhalb des erwarteten Bereiches von 500 bp bis 600 bp.

A.2.9 Allgemeine Qualitätssicherung und Auswertung der Ergebnisse

Es wird angenommen, dass die Zielsequenz nachgewiesen ist, wenn die Größe des PCR-Produktes der erwarteten Länge der Target-DNA-Sequenz entspricht.

Hinsichtlich der Identifizierungszwecke siehe A.2.8.

Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 500 bp bis 600 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA aus Pflanzen innerhalb der in A.2.2.2 beschriebenen abgeschätzten Spezifitätsbeschränkungen enthält.

Zu Einzelheiten der elektrophoretischen Verfahrensschritte siehe ISO 21571:2005, B.2.

6) GeneAmp® 2400 und 9600 sowie AmpliTaq®-DNA-Polymerase sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte, die bei Applied Biosystems, vormals Perkin Elmer/Applied Biosystems, bezogen werden können. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

A.3 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches und GMO-Screening-Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Tomaten und/oder gentechnisch modifizierten Zeneca®-Tomaten stammt

A.3.1 Allgemeines

Dies ist ein Routineverfahren zum Nachweis einer artspezifischen Single-copy-DNA-Sequenz, die in Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) vorkommt.

Das Verfahren darf auch als Screening-Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Tomaten mit verzögerter Reifung (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mill. Zuchtsorte Ailsa Craig Sorte Nema 282F) angewendet werden.

Es gibt keine Beschreibung einer Methode zur Verifizierung der Identität des PCR-Produktes. Deshalb kann dieses Verfahren nicht als Identifizierungsverfahren angesehen werden. Das Verfahren darf zur Beurteilung der Amplifizierbarkeit der aus Tomaten extrahierten DNA angewendet werden.

A.3.2 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.3.2.1 Ringversuch

Dieses Verfahren wurde in einem Ringversuch [15] validiert, der von der Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zum Nachweis mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschlands nach § 35 des LMBG organisiert wurde. Für die DNA-Extraktion wurde das in ISO 21571:2005, A.3, angeführte CTAB-Verfahren angewendet.

Die Daten des Ringversuchs sind in Tabelle A.7 angegeben.

Tabelle A.7 — Ergebnisse des Ringversuchs

Jahr	1998
Anzahl der Laboratorien	19
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	18
Anzahl der Proben je Laboratorium	5
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	90
Anzahl der Proben, die <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Zuchtsorte Ailsa Craig Sorte Nema 282F (Zeneca) enthalten	43
Anzahl der Proben, die <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Zuchtsorte Ailsa Craig Sorte Nema 282C (nicht gentechnisch modifiziert) enthalten	47
Falsch positive Ergebnisse	0 (0 %)
Falsch negative Ergebnisse	0 (0 %)

Ein weiterer Ringversuch wurde nach den in ISO 5725-2 festgelegten Kriterien vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschlands im Rahmen des Europäischen Projektes SMT4-CT96-2072 durchgeführt. Für die DNA-Extraktion wurde das in ISO 21571:2005, A.3, angeführte CTAB-Verfahren angewendet (jedoch mit einer Teilprobe von 100 mg).

Tabelle A.8 — Ergebnisse des Ringversuchs 2

Jahr	1998
Anzahl der Laboratorien	21
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	19
Anzahl der Proben je Laboratorium	10
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	190
Anzahl der Proben, die <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Zuchtsorte Ailsa Craig Sorte Nema 282F (Zeneca) enthalten	88
Anzahl der Proben, die <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. Zuchtsorte Ailsa Craig Sorte Nema 282C (nicht gentechnisch modifiziert) enthalten	102
Falsch positive Ergebnisse	0 (0 %)
Falsch negative Ergebnisse	0 (0 %)

A.3.2.2 Molekulare Spezifität

A.3.2.2.1 Allgemeines

Dieser Anhang erfüllt die in Abschnitt 7 angeführten Anforderungen.

Dieses Verfahren wurde für Zielsequenzen entwickelt, die z. B. unter der GenBank® Eintrag-Nummer X04583 beschrieben sind.

A.3.2.2.2 Theoretisch

Bei Datenbankrecherchen (NCBI BlastN® Recherche, EMBL-Datenbank, 28. September 2001) wurde keine Sequenz-Homologie mit DNA-Sequenzen außer von Pflanzenarten festgestellt. Beide Primer stimmen zu 100 % mit den folgenden Datenbankeinträgen überein: X14074 (Tomatengene für die Zellwand zerstörende Polygalacturonase), X05656 (Tomaten-mRNA für Polygalacturonase), M37304 (Tomatenpolygalacturonase (PG)-Gen), X04583 (Tomaten-mRNA für Polygalacturonase-2a), A24194 (*L.esculentum* Polygalacturonase-Klon), A15981 (*L.esculentum* mRNA für Polygalacturonase-2a), I01809 (Nukleotid Sequenz 1 vom Patent US4801540) und AX062336 (Sequenz 1 vom Patent WO0078982).

A.3.2.2.3 Experimentell

Bei der Verwendung von DNA aus anderen Kulturpflanzen wurde keine Amplifikation festgestellt [16].

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz wurde nicht bestimmt, es wird jedoch vermutet, dass es sich um ein Single-copy-Gen handelt.

A.3.2.3 Nachweisgrenze (LOD)

Die absolute LOD wurde nicht bestimmt, es wurde jedoch nachgewiesen, dass mit dem Verfahren ein DNA-Fragment von mindestens 0,1 ng aus frischen Tomaten extrahierte DNA (fluorimetrisch bestimmt) amplifiziert werden kann.

A.3.3 Anpassung

Die Verwendung von hoch verarbeiteten Proben kann durch mögliches Fehlen von Target-Fragmenten mit einer Länge von 383 bp zu negativen Ergebnissen führen.

Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 383 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA aus Tomaten enthält, während Fragmente von 180 bp anzeigen, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA aus gentechnisch modifizierten Tomaten (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mill. Zuchtsorte Ailsa Craig Sorte Nema 282F) enthält.

A.3.4 Kurzbeschreibung

Das Polygalacturonase-Gen (PG-Gen) kodiert ein PG-Enzym, das mit der Reifung in Zusammenhang steht. Dieses Verfahren amplifiziert das endogene PG-Gen [17] mit einer Fragmentgröße von 383 bp. In gentechnisch modifizierten Zeneca-Tomaten wird ein zweites Fragment von 180 bp amplifiziert, das von der übertragenen verkürzten cDNA des PG-Gens [18], [19] stammt.

A.3.5 Reagenzien

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 24276.

A.3.5.1 Wasser

A.3.5.2 PCR-Pufferlösung (ohne $MgCl_2$), 10-fach

A.3.5.3 $MgCl_2$ -Lösung, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$

A.3.5.4 dNTP-Lösung, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (von jedem)

A.3.5.5 Oligonukleotide

A.3.5.5.1 Forward Primer

PG-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer X04583)

Primer PG34L: 5'-ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT-3'

A.3.5.5.2 Reverse Primer

PG-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer X04583)

Primer PG34R: 5'-CgT Tgg TgC ATC CCT gCA Tgg-3'

A.3.5.6 Thermostabile DNA-Polymerase (für hot-start-PCR), 5 IU/ μl

A.3.6 Prüfeinrichtung

Nach A.1.6.

A.3.7 Durchführung

A.3.7.1 PCR-Ansatz

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen je PCR-Ansatz von 25 μl mit den in Tabelle A.9 angegebenen Reagenzien. Die PCR darf auch in einem größeren Volumen durchgeführt werden, wenn die Lösungen entsprechend angepasst werden. Die in Tabelle A.9 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

Tabelle A.9 — Zugabe von Reagenzien

Reagenz	Endkonzentration	Volumen je Probe μl
DNA-Probe	10 ng bis 50 ng	1
Wasser		16,8
10-fache PCR-Pufferlösung (ohne MgCl ₂)	1fach	2,5
MgCl ₂ -Lösung ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
dNTP-Lösung, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1
Primer PG34L, 10 μmol/l	0,4 μmol/l	1
Primer PG34R, 10 μmol/l	0,4 μmol/l	1
Taq-DNA-Polymerase, 5 IU/μl	1 IU	0,2
^a Falls die PCR-Pufferlösung schon MgCl ₂ enthält, wird die Endkonzentration an MgCl ₂ im Reaktionsgemisch auf 1,5 mmol/l eingestellt.		

A.3.7.2 PCR-Kontrollen

Als positive Kontrolle dafür, ob die Anwendung des Verfahrens für die taxonomische Zielgruppe spezifisch ist, kann DNA aus frischen Tomaten verwendet werden. Es ist jedoch im Handel keine positive Kontrolle für die verkürzte Genversion erhältlich, die in gentechnisch modifizierten Tomaten vorkommt⁷⁾.

Alle weiteren geeigneten Kontrollen sollten wie in ISO 24276 beschrieben einbezogen werden.

A.3.7.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle A.10 angegebene Temperatur-Zeit-Programm wurde bei der Validierung in einem Ringversuch angewendet, wobei die Thermocycler GeneAmp® 2400 oder GeneAmp® 9600 und AmpliTaq Gold®-DNA-Polymerase⁸⁾ eingesetzt wurden. Bei der Anwendung anderer Thermocycler kann eine Anpassung erforderlich sein. Die Zeit für die Aktivierung/initialen Denaturierung hängt von der verwendeten Polymerase ab. Falls eine hot-start-Polymerase verwendet wird, sollten die Empfehlungen des Herstellers eingehalten werden, sofern in der Vorschrift nicht anderes festgelegt ist.

Tabelle A.10 — Temperatur-Zeit-Programm

Aktivierung/initialen Denaturierung	10 min/95 °C
Amplifikation	30 s/94 °C
	60 s/60 °C
	60 s/72 °C
Anzahl der Zyklen	35
Abschließende Elongation	6 min/72 °C

7) Zur Verfügbarkeit geeigneten Kontrollmaterials kann das zuständige nationale Normungsinstitut befragt werden.

8) GeneAmp® 2400 und 9600 sowie AmpliTaq Gold®-Polymerase sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte, die bei Applied Biosystems, vormals Perkin Elmer/Applied Biosystems, bezogen werden können. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

A.3.8 Identifizierung

Bis jetzt basiert die Identifizierung nur auf der Größe des PCR-Produktes.

A.3.9 Allgemeine Qualitätssicherung und Auswertung der Ergebnisse

Die Zielsequenz gilt als nachgewiesen, wenn die Größe des PCR-Produktes der erwarteten Länge der Target-DNA-Sequenz entspricht, bestimmt durch Vergleich mit Produkten, die aus Referenzmaterial abgeleitet wurden, das aus Tomaten hergestellt wurde.

Hinsichtlich der Identifizierungszwecke siehe A.3.8.

Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 383 bp und 180 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA aus Tomaten und gentechnisch modifizierten Zeneca-Tomaten innerhalb der in A.3.2.2 beschriebenen abgeschätzten Spezifitätsbeschränkungen enthält.

Zu Einzelheiten der elektrophoretischen Verfahrensschritte siehe ISO 21571:2005, B.2.

A.4 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Mais

A.4.1 Allgemeines

Dieses Verfahren ist ein Routineverfahren zum Nachweis einer artspezifischen Single-copy-Sequenz des Invertase-Gens in Mais (*Zea mays*).

Es gibt keine Beschreibung einer Methode zur Verifizierung der Identität des PCR-Produktes. Deshalb kann dieses Verfahren nicht als Identifizierungsverfahren angesehen werden. Das Verfahren darf zur Beurteilung der Amplifizierbarkeit der aus Mais extrahierten DNA angewendet werden.

A.4.2 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.4.2.1 Ringversuch

Dieses Verfahren wurde in mehreren Ringversuchen durch die Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zum Nachweis mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschlands zur Umsetzung von § 35 des LMBG validiert. Für die DNA-Extraktion wurde von der Hälfte der Teilnehmer das in ISO 21571:2005, A.3, angeführte CTAB-Verfahren und von der anderen Hälfte der Teilnehmer das Wizard®-DANN-Clean-UP-System⁹⁾ angewendet.

Die Daten des Ringversuchs sind in Tabelle A.11 angegeben.

9) Wizard®-DNA-Clean-Up-System ist ein Beispiel für geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO.

Tabelle A.11 — Ergebnisse des Ringversuchs [20]

Jahr	1999
Anzahl der Laboratorien	18
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	16
Anzahl der Proben je Laboratorium	6
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	96
Anzahl der Proben, die Bt 176 enthalten	32
Anzahl der Proben, die Bt 11 enthalten	32
Anzahl der Proben, die keinen GM-Mais enthalten	32
Falsch positive Ergebnisse	0 (0 %)
Falsch negative Ergebnisse	0 (0 %)

A.4.2.2 Molekulare Spezifität

A.4.2.2.1 Allgemeines

Dieser Anhang erfüllt die in Abschnitt 7 angeführten Anforderungen.

Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung der Zielsequenz entwickelt, die unter der GenBank® Eintragsnummer U16123 beschrieben ist.

A.4.2.2.2 Theoretisch

Das aus einer Datenbank über DNA-Sequenzen erhaltene Mais-Invertase-Gen wurde als Zielsequenz ausgewählt.

Bei Datenbank-Recherchen (NCBI BlastN® Recherche, EMBL-Datenbank, 28. September 2001) wurde eine gewisse Sequenzhomologie mit DNA-Sequenzen anderer landwirtschaftlich bedeutender Pflanzen (Hülsenfrüchte, Getreide, Gemüse) sowie menschlicher und Insekten-DNA herausgefunden.

Primer IVR1-F wird wieder aufgefunden in:

- AF171874 *Zea mays* lösliche saure Invertase IVR1 (100 % Übereinstimmung)
- AX033517 Sequenz 25 vom Patent DE19906169 (21 zusammenhängende Nukleotide stimmen überein)
- AX033514 Sequenz 22 vom Patent DE19906169 (21 zusammenhängende Nukleotide stimmen überein)

Primer IVR1-R wird wieder aufgefunden in:

- AF171874 *Zea mays* lösliche saure Invertase IVR1 (100 % Übereinstimmung)
- AX150234 Sequenz 30 vom Patent WO0132919 (100 % Übereinstimmung)
- AJ224681 *Triticum aestivum* mRNA für Beta-Fructosidase (20 zusammenhängende Nukleotide stimmen überein)
- AF062735 *Saccharum officinarum* lösliche saure Invertase (19 zusammenhängende Nukleotide stimmen überein)
- AF062734 *Saccharum robustum* lösliche saure Invertase (19 zusammenhängende Nukleotide stimmen überein)

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz wurde nicht bestimmt, es wird jedoch vermutet, dass es sich um ein Single-copy-Gen handelt.

A.4.2.2.3 Experimentell

Das Mais-PCR-Assay hat sich als sehr spezifisch für Mais-DNA erwiesen [21].

A.4.2.3 Nachweisgrenze (LOD)

Die absolute LOD wurde nicht bestimmt, es wurde jedoch nachgewiesen, dass mit dem Verfahren $\leq 0,1$ ng aus Maiskörner extrahierte Mais-DNA (fluorimetrisch bestimmt) amplifiziert werden können [20].

A.4.3 Anpassung

Es sind keine besonderen Angaben vorhanden.

A.4.4 Kurzbeschreibung

Das Mais-Invertase-Gen kodiert ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels.

Ein 226-bp-Fragment des Mais-Invertase-Gens wird durch PCR amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

A.4.5 Reagenzien

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 24276.

A.4.5.1 Wasser

A.4.5.2 PCR-Pufferlösung (ohne MgCl_2), 10-fach

A.4.5.3 MgCl_2 -Lösung, $c(\text{MgCl}_2) = 25$ mmol/l

A.4.5.4 dNTP-Lösung, $c(\text{dNTP}) = 2,5$ mmol/l (von jedem)

A.4.5.5 Oligonukleotide

A.4.5.5.1 Forward Primer

Mais-Invertase-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer U16123)

Primer IVR1-F: 5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'

A.4.5.5.2 Reverse Primer

Mais-Invertase-Gen (GenBank® Eintrag-Nummer U16123)

Primer IVR1-R: 5'-ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'

A.4.5.6 Thermostabile DNA-Polymerase (für hot-start-PCR), 5 IU/ μl

A.4.6 Prüfeinrichtung

Nach A.1.6

A.4.7 Durchführung

A.4.7.1 PCR-Ansatz

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen je PCR-Ansatz von 25 µl mit den in Tabelle A.12 angegebenen Reagenzien. Die PCR kann auch in einem größeren Volumen durchgeführt werden, wenn die Lösungen entsprechend angepasst werden. Die in Tabelle A.12 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

Tabelle A.12 — Zugabe von Reagenzien

Reagenz	Endkonzentration	Volumen je Probe µl
DNA-Probe	10 ng bis 50 ng	2
Wasser		15,3
10-fache PCR-Pufferlösung (ohne MgCl ₂)	1fach	2,5
MgCl ₂ -Lösung ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
dNTP-Lösung, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1
Primer IVR1-F, 10 µmol/l	0,5 µmol/l	1,25
Primer IVR1-R, 10 µmol/l	0,5 µmol/l	1,25
Taq-DNA-Polymerase, 5 IU/µl	1 IU	0,2
^a Falls die PCR-Pufferlösung schon MgCl ₂ enthält, wird die Endkonzentration an MgCl ₂ im Reaktionsgemisch auf 1,5 mmol/l eingestellt.		

A.4.7.2 PCR-Kontrollen

Als positive Kontrolle können zertifizierte Referenzmaterialien vom IRMM, z. B. von Mais Bt 11 (IRMM-412) oder Event 176 (Bt 176) (IRMM-411), verwendet werden.

Alle weiteren geeigneten Kontrollen sollten wie in ISO 24276 beschrieben einbezogen werden.

A.4.7.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle A.13 angegebene Temperatur-Zeit-Programm wurde bei der Validierungsuntersuchung angewendet, wobei die Thermocycler GeneAmp® 2400 oder GeneAmp® 9600 und AmpliTaq Gold®-DNA-Polymerase¹⁰⁾ eingesetzt wurden. Bei der Anwendung anderer Thermocycler kann eine Anpassung erforderlich sein. Die Zeit für die Aktivierung/initiale Denaturierung hängt von der verwendeten Polymerase ab. Falls eine hot-start-Polymerase verwendet wird, sollten die Empfehlungen des Herstellers eingehalten werden, sofern in der Vorschrift nicht anderes festgelegt ist.

10) GeneAmp® 2400 und 9600 und AmpliTaq Gold®-Polymerase sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte, die bei Applied Biosystems, vormals Perkin Elmer/Applied Biosystems, bezogen werden können. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Tabelle A.13 — Temperatur-Zeit-Programm

Aktivierung/initiale Denaturierung	12 min/95 °C
Amplifikation	30 s/95 °C
	30 s/64 °C
	60 s/72 °C
Anzahl der Zyklen	35
Abschließende Elongation	10 min/72 °C

A.4.8 Identifizierung

Bis jetzt basiert die Identifizierung nur auf der Größe des PCR-Produktes.

A.4.9 Allgemeine Qualitätssicherung und Auswertung der Ergebnisse

Die Zielsequenz gilt als nachgewiesen, wenn die Größe des PCR-Produktes der erwarteten Länge der Target-DNA-Sequenz entspricht, bestimmt durch Vergleich mit Produkten, die aus zertifiziertem Referenzmaterial abgeleitet wurden, das aus Mais (z. B. IRMM-412 [Bt 11-Mais]- oder IRMM-411 [Event 176-Mais]-Reihe von IRMM, Geel, Belgien) hergestellt wurde.

Hinsichtlich der Identifizierungszwecke siehe A.4.8.

Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 226 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA aus Mais innerhalb der in A.4.2.2 beschriebenen abgeschätzten Spezifitätsbeschränkungen enthält.

Zu Einzelheiten der elektrophoretischen Verfahrensschritte siehe ISO 21571:2005, B.2.



A.5 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt

A.5.1 Zweck, Relevanz und wissenschaftliche Grundlage

Vom GMO Detection Laboratory der Shanghai Jiao Tong University (GMDL-SJTU) wurde ein Ringversuch zur Validierung der Anwendbarkeit eines für die taxonomische Zielgruppe spezifischen Verfahrens organisiert, wobei für die qualitative Analyse von gentechnisch modifiziertem (GM) oder Nicht-GM-Reis das Sucrose-Phosphat-Synthase (SPS)-Gen als endogenes Gen verwendet wird. Am Ringversuch nahmen zwölf Laboratorien aus Spanien, Korea, Litauen, Slowenien, Japan, Italien und China teil.

Die Verfahrensvorschrift für den Ringversuch umfasste die folgenden Module:

- qualitative PCR zur Validierung der Heterogenität des SPS-Gens innerhalb von Reissorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft;
- qualitative PCR zur Validierung der Artspezifität des SPS-Gens für Reis;
- qualitative PCR zur Bewertung der Nachweisgrenze (LOD) des festgelegten qualitativen SPS-PCR-Assays.

Der Ringversuch wurde nach [44] durchgeführt.

Die Ergebnisse des Ringversuchs sowie die zugehörige Vorschrift sind in A.5.3 angeführt.

A.5.2 Kurzbeschreibung

Das Verfahren wurde für Reissaatgut und andere verarbeitete Reisprodukte wie Reismehl optimiert. Die Anwendbarkeit des *SPS*-Gens wurde in diesem Ringversuch bewertet, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die aus Reissaatgut und anderen Pflanzenmaterialien extrahiert wurden.

Der Organisator des Ringversuchs stellte den Teilnehmern des Ringversuchs die verfahrensspezifischen Reagenzien (Primer, Sonden, Reaktions-Mastermix) und die zu untersuchenden, aus Reismaterialien extrahierten DNA-Proben zur Verfügung.

A.5.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.5.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit des qualitativen PCR-Systems für den Nachweis des *SPS*-Gens wurde bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen (d. h. 56 °C, 58 °C und 60 °C) an drei verschiedenen DNA-Proben mit bekannten Mengen an Reis-DNA (Proben mit 10 ng, 1 ng, 0,1 ng Reis-Genom-DNA) und mit drei Wiederholungen je Probe geprüft. Bei dem qualitativen PCR-System wurde die erwartete Robustheit nachgewiesen und das System wies bei allen drei Annealing-Temperaturen und drei Konzentrationen der Reis-DNA-Proben ein gutes Leistungsverhalten auf.

Das qualitative PCR-System für den Nachweis des *SPS*-Gens wurde auch an verschiedenen Thermocyclern (PTC-100¹¹⁾, MJ Research und Geräte von Bio-Rad und Applied Biosystems) mit drei verschiedenen Reaktionsvolumina (25 µl, 30 µl und 50 µl) und drei Wiederholungen je Volumen geprüft. Es wies die erwartete Robustheit und bei den verschiedenen Thermocyclern und Reaktionsvolumina ein gutes Leistungsverhalten auf.

A.5.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Das *SPS*-Gen aus Reis wurde in [44] als geeignet für die Verwendung als ein endogenes Referenzgen zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Reis beschrieben. Die genauen technischen Angaben wurden in modifizierter Form aus [44] übernommen.

Im Ringversuch wurden zur Probenvorbereitung alle DNA-Proben vom GMDL-SJTU nach dem in ISO 21571:2005, A.3, übernommenen CTAB-Verfahren extrahiert. Die quantitative Bestimmung der extrahierten DNA durch spektralphotometrische Messung erfolgte nach einem aus ISO 21571:2005, B.1, übernommenen Verfahren. Nach der quantitativen Bestimmung der DNA wurde eine qualitative PCR unter Anwendung eines 18S-PCR-Systems [45] durchgeführt, um Angaben über eine mögliche PCR-Inhibition zu erhalten.

Das System für die PCR des *SPS*-Gens wurde unter Verwendung von Reis-Genom-DNA von drei Forschern am GMDL-SJTU geprüft. Die Ergebnisse waren zufriedenstellend; insbesondere für die qualitative PCR zeigen die Ergebnisse, dass das *SPS*-Gen für Reis spezifisch ist, die LOD liegt bei etwa 0,1 %.

A.5.3.3 Ringversuch

Für den Ringversuch erhielt jeder Teilnehmer zwölf Proben von Reis-DNA für die Prüfung auf Heterogenität, zehn DNA-Proben von Pflanzen außer Reis und eine DNA-Probe von Reis zur Prüfung auf Artspezifität sowie zehn reihenverdünnte Reisproben zur Bewertung der LOD. Außerdem wurden eine negative und eine positive Kontrolle einbezogen.

¹¹⁾ Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokumentes und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO.

Die Heterogenität des *SPS*-Gens innerhalb von Reissorten wurde unter Verwendung von zwölf Reissorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft in China, wie z. B. Najing14, Taipei309, Shengnong265, Jinyinbao, Minghui78, Huke3, Guangluai4, Zhe733, Hejiang19, Baizhehu, Xiangwanxian9 und Nipponbare, bewertet. Die von den zwölf Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigten, dass von insgesamt 144 (12×12) Proben von Reis-DNA mit dem System für die PCR des *SPS*-Gens 143 positive Ergebnisse erhalten wurden. Das bedeutet, dass der Anteil falsch negativer Ergebnisse (Falsch-negativ-Rate) des Systems für die PCR des *SPS*-Gens für Reis bei 0,69 % (1/144) liegt (siehe Tabelle A.14). Diese Daten weisen auf eine geringe Heterogenität des *SPS*-Gens in der Zielregion hin.

Die Artspezifität des *SPS*-Gens wurde mit einer Probe von Reis-Genom-DNA (Guangluai4) und zehn weiteren Pflanzen-DNA validiert, die mit Reis verwandt, gewöhnliche Kulturpflanzen oder Modellpflanzen waren, wie z. B. die Fruchtmaterialien von Bambus (*Phyllostachys*), Grüner Borstenhirse (*Setaria viridis* (Linn.) Beauv), Gerste (*Hordeum vulgare*), Weizen (*Triticum aestivum*), Kolbenhirse (*Setaria italica*), Raps (*Brassica napus*), Tomate (*Lycopersicon esculentum*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Sojabohne (*Glycine max*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Die von den zwölf Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigten, dass von insgesamt 120 (10×12) Proben von nicht aus Reis stammender Pflanzen-DNA mit dem System für die PCR des *SPS*-Gens 118 negative Ergebnisse erhalten wurden. Das bedeutet, dass der Anteil falsch positiver Ergebnisse (Falsch-positiv-Rate) des Systems für die PCR des *SPS*-Gens für die anderen zehn Pflanzenmaterialien bei 1,67 % (2/120) lag (siehe Tabelle A.14). Diese Daten weisen darauf hin, dass das *SPS*-Gen für den Nachweis von Reis artspezifisch ist.

Tabelle A.14 — Ergebnisse der Prüfung auf Heterogenität und der qualitativen PCR auf Spezifität

Parameter (Ringversuch von 2007)	Wert
Anzahl der Laboratorien	12
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	12
Anzahl der Proben je Laboratorium	22
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	264
Anzahl der Proben, die Reis enthalten	144
Anzahl der Proben, die keinen Reis enthalten	120
Falsch positive Ergebnisse	2 (1,67 %)
Falsch negative Ergebnisse	1 (0,69 %)

Die LOD des Systems für die PCR des *SPS*-Gens wurde mit qualitativer PCR und einem gemischten Mehl validiert, das Mais und verschiedene Mengen von Reissaatgut enthält: sämtliche der zwölf Laboratorien wiesen das *SPS*-Gen in der aus dem gemischten Mehl extrahierten DNA-Probe nach, die 0,1 % (Massenanteil) oder mehr Reis enthielt, und zwei der zwölf Laboratorien wiesen es in 0,01 % (Massenanteil) Reis nach, der im gemischten Mehl enthalten war. Diese Daten weisen darauf hin, dass die LOD des Systems für die PCR des *SPS*-Gens 0,1 % (Massenanteil) beträgt (siehe Tabelle A.15).

Tabelle A.15 — Ergebnisse der Prüfung der qualitativen PCR bezüglich der LOD

Parameter (Ringversuch von 2007)	Massenanteil Reis-Mais ($W_{\text{Reis}}/W_{\text{Mais}}$)				
	10 %	1 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
Anzahl der Laboratorien	12	12	12	12	12
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	12	12	12	12	12
Anzahl der Proben je Laboratorium	2	2	2	2	2
Anzahl der angenommenen Ergebnisse der Laboratorien	12	12	12	12	12
Positive Ergebnisse	12 (100 %)	12 (100 %)	12 (100 %)	4 (33,33 %)	2 (16,67 %)

A.5.3.4 Molekulare Spezifität

A.5.3.4.1 Allgemeines

Zur qualitativen Validierung des *SPS*-Gens als ein spezifisches Reis-Gen wurde ein 279-bp-Fragment der konservierten Region des *SPS*-Gens ausgewählt und mit spezifischen Primern amplifiziert.

A.5.3.4.2 Experimentell

Die aus den elf verschiedenen Pflanzenmaterialien (einschließlich Reis) extrahierten DNA-Proben wurden wie in [44] beschrieben mit dem PCR-System für das *SPS*-Gen analysiert. Von den elf Proben führte nur die Reis-DNA zu positiven Ergebnissen. Die anderen zehn Proben (siehe A.5.3.3) führten zu negativen Ergebnissen.

Die aus zwölf verschiedenen Reissorten extrahierten DNA-Proben wurden mit dem in [44] beschriebenen PCR-System für das *SPS*-Gen analysiert. Alle zwölf Proben führten zu positiven Ergebnissen.

A.5.3.4.3 Theoretisch

Die theoretische Spezifität des Primers für das *SPS*-Gen wurde durch Suche nach Homologien unter Anwendung des Programms BLASTN 2.0MP-WashU ([82] Datum der Recherche: 9. Januar 2010) beurteilt. Die zur Abfrage verwendete 279-bp-Sequenz ist Teil der NCBI-Eintrag-Nummer U33175 (Nukleotide 1055 bis 1333). Die Ergebnisse der BLAST-Recherche (en: basic local alignment search tool) bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit der *SPS*-Gen-Sequenz von Reis und die fehlende Homologie mit anderen Genen und Arten.

A.5.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Diese Methode ist ein PCR-Verfahren zur Anwendbarkeit des *SPS*-Gens als ein endogenes Reisgen beim qualitativen Nachweis von GM- oder Nicht-GM-Reis. Die Heterogenität, Artspezifität des *SPS*-Gens und LOD wurden als Teil der Validierung des vorliegenden Verfahrens beurteilt. Das PCR-Produkt mit einer Länge von 279 bp wurde durch Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

A.5.5 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die Begriffe nach ISO 5725-1 [40] und ISO 24276.

A.5.6 Probenart und -mengen

Nachstehend sind die Daten aus dem Ringversuch als Beispiele für Probenarten und -mengen angeführt, die für das vorliegende Verfahren geeignet sind.

In diesem Ringversuch wurden DNA-Proben verwendet, die aus den Samen von zwölf Reissorten, zehn weiteren Pflanzenmaterialien (siehe A.5.3.3) und dem gemischten Mehl, das verschiedene Gehalte an Reis in Maismehl enthielt, extrahiert worden waren.

Die Teilnehmer erhielten die folgenden Proben:

- zwölf DNA-Proben von 12 verschiedenen Reissorten, die in verschiedenen Gebieten Chinas häufig angebaut werden (d. h. Naging14, Taipei309, Shengnong265, Jinyinbao, Minghui78, Huke3, Guangluai4, Zhe733, Hejiang19, Baizhehu, Xiangwanxian9 und Nipponbare), 20 ng/µl, jeweils 50 µl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Heterogenität des *SPS*-Gens innerhalb von Reissorten verwendet;
- elf DNA-Proben von Reis (Guangluai4) und weiteren zehn Pflanzenmaterialien, die mit Reis verwandt (d. h. Bambus, grüne Borstenhirse, Gerste, Weizen, Kolbenhirse), gewöhnliche GM-Kulturpflanzen (d. h. Raps, Tomate, Kartoffel, Sojabohne) oder Modellpflanzen (d. h. Ackerschmalwand) sind, 20 ng/µl, jeweils 50 µl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Artspezifität des *SPS*-Gens in Reis verwendet;

- zehn DNA-Proben von dem gemischten Mehl aus Mais und verschiedenen Massenanteilen an Reis, 20 ng/µl, jeweils 50 µl. Diese DNA-Proben waren Doppelblindproben einer Reihe von fünf Konzentrationen, die zur Prüfung der LOD des PCR-Systems für das *SPS*-Gen verwendet wurden;
- negative DNA-Zielkontrolle (bezeichnet als N): DNA aus Lachssperma (20 ng/µl);
- positive DNA-Zielkontrolle (bezeichnet als P): genomische DNA von Reis (Guangluai4) (20 ng/µl). Sämtliche DNA-Proben wurden von GMDL-SJTU unter Anwendung des CTAB-Verfahrens gereinigt. Die negativen und positiven DNA-Zielkontrollen wurden bei jeder PCR-Platte verwendet;
- Folgende Reaktionsreagenzien, Primer für das PCR-System des *SPS*-Gens:
 - Primerpaar für die herkömmliche PCR: SPS-F/SPS-R;
 - DNA-Verdünnungslösung (0,1 x Tris-EDTA (TE)-Pufferlösung, 1,2 ml).

A.5.7 Nachweisgrenze und Anwendungsbereich

Die DNA wurde aus fünf Proben von gemischtem Mehl, die unterschiedliche Mengen an Reis enthielten, extrahiert. Diese Proben wurden wie in [44] beschrieben mit dem PCR-System für das *SPS*-Gen analysiert. Bei den Proben, die Massenanteile von 10 %, 1 % und 0,1 % Reis enthielten, wurden positive Ergebnisse erzielt. Die anderen beiden Proben (mit Massenanteilen von 0,05 % und 0,01 %) führten zu negativen Ergebnissen.

In Übereinstimmung mit dem entwickelten Verfahren beträgt die relative LOD des qualitativen PCR-Verfahrens etwa 0,1 % (Massenanteil). Das System für die PCR des *SPS*-Gens kann für den spezifischen Nachweis und die Identifizierung von Reismaterialien in anderen Pflanzenmaterialien verwendet werden.

A.5.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Vergleichpräzision des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe A.5.3.3).

A.5.9 Störungen

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden keine zusätzlichen Hinweise über Störungen berichtet.

A.5.10 Physikalische und Umgebungsbedingungen

Siehe ISO 24276 zu Einzelheiten, wie z. B.

- die Aufrechterhaltung streng getrennter Arbeitsbereiche für DNA-Aufbereitung, PCR-Ansatz, PCR-Amplifikation und Elektrophorese;
- vor dem Gebrauch sollten sämtliche DNA-Rückstände von der gesamten Ausrüstung entfernt werden;
- zur Vermeidung von Kontamination werden Aerosol-geschützte Filterpipettenspitzen verwendet;
- es werden nur puderfreie Handschuhe verwendet, und diese sind oft zu wechseln.

A.5.11 Geräte und Hilfsmittel

A.5.11.1 Mikrozentrifuge

A.5.11.2 Gefrierschrank bei –20 °C und Kühlschranks bei 4 °C

A.5.11.3 Mikropipetten

A.5.11.4 Mischer, z. B. Vortex-Mischer

A.5.11.5 Mikrozentrifugenröhrchen, 0,2 ml, 1,5 ml und 2,0 ml

A.5.11.6 Spitzen und Aerosol-geschützte Spitzen für Mikropipetten

A.5.11.7 Gestell für Reaktionsgefäße

A.5.11.8 PVC oder Latexhandschuhe

A.5.11.9 Gerät für die Amplifikation der DNA (Thermocycler oder ein gleichwertiges Gerät)

A.5.11.10 Elektrophoresegerät mit Netzanschluss

A.5.11.11 Bildgebendes System für die Gel-Analyse

A.5.11.12 Mikrowellengerät (wahlfrei)

A.5.12 Chemikalien und Hilfsmittel

A.5.12.1 Allgemeines

Wenn nicht anders angegeben, sind nur Reagenzien nach ISO 24276 verwendet worden und nur Wasser für die Molekularbiologie oder Wasser von vergleichbarer Reinheit.

A.5.12.2 Qualitative PCR

A.5.12.2.1 PCR-Pufferlösung (ohne $MgCl_2$), 10-fach

A.5.12.2.2 $MgCl_2$ -Lösung, 25 mmol/l

A.5.12.2.3 dNTP-Lösung, von jedem 2,5 mmol/l

A.5.12.2.4 Primer (siehe Tabelle A.16)

A.5.12.2.5 Thermostabile DNA-Polymerase

A.5.12.3 Elektrophorese

Zu Einzelheiten siehe z. B. ISO 21571:2005, B.1.

A.5.12.3.1 Beladungspufferlösung (10 g/l SDS, 500 g/l Glycerol, 0,5 g/l Bromphenolblau), 10-fach konzentriert

A.5.13.3.2 DNA-Größenstandard

A.5.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen dürfen bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung sind -20 °C erforderlich.

A.5.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Es muss sichergestellt werden, dass die Untersuchungsprobe für die Laboratoriumsprobe repräsentativ ist, z. B. durch Vermahlen oder Homogenisieren. Die zu berücksichtigenden Maßnahmen und Arbeitsschritte sind in ISO 21571 und ISO 24276 beschrieben.

A.5.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte, z. B. Thermocycler und Pipetten, sollten nach ISO/IEC 17025 [41] kalibriert werden.

A.5.16 Analysenschritte

A.5.16.1 Aufbereitung der DNA für die qualitative PCR

Die DNA wird aus der Probe mit einem geeigneten Extraktionsverfahren, z. B. dem in ISO 21571:2005, A.3, beschriebenen CTAB-Verfahren extrahiert. Die DNA-Proben für die PCR werden aufgetaut, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Aufgetaute Reagenzien werden bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt.

A.5.16.2 PCR-Reagenzien

A.5.16.2.1 Herkömmlicher PCR-Mastermix

Ein herkömmliches PCR-Reaktionsgemisch, das Folgendes enthält: einfach konzentrierte PCR-Pufferlösung, 200 µmol/l von jedem dNTP, 2,5 mmol/l Mg²⁺, 330 nmol/l forward/reverse Primer, 1 U Taq-DNA-Polymerase.

A.5.16.2.2 Primer

Siehe Tabelle A.16.

Tabelle A.16 — Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die qualitative PCR

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids (5' nach 3')
Primersequenz für die qualitative PCR	
SPS-Primer F	TTg CgC CTg AAC ggA TAT
SPS-Primer R	ggA gAA gCA CTg gAC gAgg

A.5.16.3 Durchführung

A.5.16.3.1 Allgemeines

Die qualitative PCR für das SPS-Gen von Reis wurde für ein Gesamtvolumen von 30 µl je Reaktionsgemisch entwickelt. Die Verwendung von 100 ng Matrizen-DNA je Reaktionsgefäß wird empfohlen.

- Der für den Versuch benötigte PCR-Mastermix wird aufgetaut, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Die aufgetauten Reagenzien werden bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt.
- 25 µl/Röhrchen des Mastermixes werden in 200-µl-PCR-Reaktionsröhrchen verteilt. 5 µl der DNA-Probenlösung, entweder der bezüglich Reis positiven Kontrolle oder der negativen Kontrolle oder der Leerwertkontrolle (H₂O) werden in die Reaktionsröhrchen gegeben.
- Der Inhalt der PCR-Röhrchen wird vorsichtig gemischt, die Röhrchen werden in der Mikrozentrifuge 10 s bei 1 000 g zentrifugiert.
- Die Platte wird in das Gerät gestellt.
- Die PCR wird unter den Bedingungen für die Zyklen der qualitativen PCR durchgeführt.

A.5.16.4 PCR-Kontrollen

Siehe 7.5 und ISO 24276.

A.5.16.5 Temperatur-Zeit-Programm

Der PCR-Assay wurde für die Anwendung in einem PCR-Thermocycler PTC-100¹¹⁾ (MJ Research) und in einem ABI 2720¹¹⁾ (Applied Biosystems) optimiert. Obwohl auch andere PCR-Geräte verwendet werden dürfen, sind die Einstellwerte des Thermocyclers möglicherweise zu verifizieren. Die Parameter der Zyklen für die Durchführung der qualitativen PCR sind in Tabelle A.17 aufgelistet.

Tabelle A.17 — Temperatur-Zeit-Programm für die qualitative PCR

Schritt	Stufe	Temperatur °C	Zeit s	Anzahl der Zyklen
1	Aktivierung und initiale Denaturierung	94	900	1
2a	Amplifikation	Denaturierung	94	35
2b		Annealing (Anlagerung)	58	
2c		Elongation (Verlängerung)	72	
3	Abschließende Elongation	72	420	1

A.5.16.6 Nachweis

- Nach Abschluss des PCR-Programms werden 3 µl der 10-fach konzentrierten Beladungspufferlösung in jedes Reaktionsröhrchen gegeben und mit den PCR-Produkten gemischt.
- Das Elektrophoresegel (20 g/l Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) wird mit jeweils 10 µl jedes PCR-Produktes beladen.
- Der Gellauf wird im Elektrophoresegerät 20 min bei 5 V/cm durchgeführt.

Das Gelbild wird mit einer UV-Geldokumentation oder einem gleichartigen System aufgezeichnet.

Das spezifische Produkt sollte ein Fragment von 279 bp sein; andere bei der Agarose-Gelelektrophorese vorliegende Banden sind unerwartete Produkte.

A.5.16.7 Annahme- oder Ablehnungskriterien

Die zur Auswertung der Ergebnisse aus dem Ringversuch angewendeten Anforderungen an die Leistung des Verfahrens sind wie folgt:

In der bezüglich Reis positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 279 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein Zielfragment nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 279 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von SPS enthält und das Ergebnis „positiv“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „negativ“.

A.5.17 Identifizierung der Proben

Alle Proben sollten eindeutig identifiziert werden.

A.5.18 Auswertung

Die erwartete Länge des Amplifikats von SPS beträgt 279 bp.

In der bezüglich Reis positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 279 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein Zielfragment nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 279 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von SPS enthält und das Ergebnis „positiv“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „negativ“.

A.6 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten

A.6.1 Zweck, Relevanz und wissenschaftliche Grundlage

Das *LAT52*-Gen kodiert ein hitzestabiles, glycosyliertes, Cystein-reiches Protein, das für die Entwicklung (Reifung) der Tomatenpollen notwendig ist. Es wurde gezeigt, dass das System zum Nachweis von *LAT52* dafür geeignet ist, als artspezifisches Gen bei der Identifizierung und quantitativen Bestimmung von GM-Tomaten eingesetzt zu werden [46]. Vom GMO Detection Laboratory der Shanghai Jiao Tong University (GMDL-SJTU) wurde ein Ringversuch zur Validierung der Anwendbarkeit des Tomatengens *LAT52* als artspezifisches Gen zur qualitativen Analyse gentechnisch modifizierter (GM) oder Nicht-GM-Tomaten organisiert. Am Ringversuch nahmen dreizehn Laboratorien aus den USA, Singapur, Korea, Litauen, Slowenien, Norwegen, Italien und China teil [47]. Die Ergebnisse sind in Tabelle A.18 und Tabelle A.19 aufgelistet.

Die Verfahrensvorschrift für den Ringversuch umfasste die folgenden Module:

- a) qualitative PCR zur Validierung der Heterogenität des *LAT52*-Gens innerhalb von Tomatensorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft;
- b) qualitative PCR zur Validierung der Artspezifität des *LAT52*-Gens für Tomaten;
- c) qualitative PCR zur Bewertung der LOD des festgelegten qualitativen *LAT52*-PCR-Assays.

Der Ringversuch wurde nach folgenden international anerkannten Leitlinien durchgeführt:

- ISO 5725-2 [39] mit besonderer Berücksichtigung in Bezug auf das Maß für die Präzision (d. h. Wiederhol- und Vergleichpräzision) und Richtigkeit;
- IUPAC-Protokoll „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies“ (Vorschrift zur Gestaltung, Durchführung und Auswertung von Studien zur Verfahrensleistung) [48].

A.6.2 Kurzbeschreibung

Das vorliegende Verfahren beschreibt den Nachweis von Tomaten-DNA unter Anwendung qualitativer PCR.

Das Verfahren wurde für Tomatensaatgut, Tomaten (Früchte), Tomatenketchup, Tomatensaft und andere verarbeitete Produkte aus Tomaten optimiert. Die Anwendbarkeit des *LAT52*-Gens wurde in einem Ringversuch untersucht, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die aus Tomatensaatgut und andere Pflanzenmaterialien extrahiert wurden.

A.6.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.6.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit des Systems für die qualitative PCR von *LAT52* wurde vom Verfahrensentwickler bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen (d. h. 56 °C, 58 °C und 60 °C) an drei verschiedenen DNA-Proben mit bekannten Mengen an DNA aus Tomatensaatgut (Proben mit 10 ng, 1 ng, 0,1 ng Tomaten-Genom-DNA und drei Wiederholungen je Probe) geprüft. Die Systeme für die qualitative PCR wiesen die erwartete Robustheit und bei allen drei Annealing-Temperaturen und drei Konzentrationen der Tomaten-DNA-Proben ein zufriedenstellendes Leistungsverhalten auf.

Das qualitative PCR-System für den Nachweis von *LAT52* wurde vom Verfahrensentwickler auch an verschiedenen Thermocyclern (PTC-100¹¹⁾ von MJ Research, S1000¹¹⁾ von Bio-Rad und ABI 9700¹¹⁾ von Applied Biosystems) mit drei verschiedenen Reaktionsvolumina (25 µl, 30 µl und 50 µl und drei Wiederholungen je Volumen) geprüft. Das qualitative PCR-System wies bei den verschiedenen Thermocyclern und Reaktionsvolumina die erwartete Robustheit auf.

A.6.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Das *LAT52*-Gen aus Tomaten hat sich bei der Validierung als geeignet für die Verwendung als artspezifisches Gen zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von GM-Tomaten erwiesen [46]. Die genauen, hier angeführten technischen Angaben sind in modifizierter Form aus [46] übernommen.

Bei der Validierungsuntersuchung wurden zur Probenvorbereitung die DNA-Proben vom GMDL-SJTU nach dem aus ISO 21571:2005, A.3, übernommenen CTAB-Verfahren extrahiert. Die quantitative Bestimmung der Menge der insgesamt extrahierten DNA durch spektralphotometrische Messung erfolgte nach einem aus ISO 21571:2005 B.1, übernommenen Verfahren. Nach der quantitativen Bestimmung der DNA wurde ein qualitativer PCR-Lauf unter Anwendung eines 18S-PCR-Systems durchgeführt, um Angaben über eine mögliche PCR-Inhibition zu erhalten [49].

Das System für die PCR von *LAT52* wurde unter Verwendung von Tomaten-Genom-DNA von drei Bearbeitern am GMDL-SJTU mit zufriedenstellenden und widerspruchsfreien Ergebnissen geprüft. Die Ergebnisse für die qualitative PCR zeigen insbesondere, dass das *LAT52*-Gen für Tomaten spezifisch ist, die relative LOD beträgt mindestens 0,1 % Massenanteil.

A.6.3.3 Ringversuch

Die Heterogenität des *LAT52*-Gens innerhalb von Tomatensorten wurde unter Verwendung von zwölf Tomatensorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft in China, wie z. B. Shengnong2, Jifan4, Zhongsu5, Yashu6, Jiafen1, Shenfeng2, Hongza9, R144, Nongyou30, Dongnong704, Lichun und Zaokui, bewertet. Die von dreizehn Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigten, dass von insgesamt 156 (12×13) Proben von Tomaten-DNA mit dem System für die PCR des *LAT52*-Gens 155 positive Ergebnisse erhalten wurden. Das bedeutet, dass die Falsch-negativ-Rate des Systems für die PCR von *LAT52* für Tomaten bei 0,64 % ($1/156$) liegt (siehe Tabelle A.18). Diese Daten weisen auf eine geringe Heterogenität des *LAT52*-Gens bei den Tomatensorten in China hin.

Die Artspezifität des *LAT52*-Gens wurde mit einer Probe von Tomaten-Genom-DNA (Jiafen1) und zehn weiteren Pflanzen-DNAs validiert, die aus stammesgeschichtlicher Sicht mit Tomate verwandt, gewöhnliche GM-Kulturpflanzen oder Modellpflanzen waren, wie z. B. die Fruchtmaterialien von Aubergine (*Solanum melongena*), Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Paprika (*Capsicum annuum*); Mais (*Zea mays*), Sojabohne (*Glycine max*), Rübsen (*Brassica rapa*), Reis (*Oryza sativa*); Blattmaterialien von Petunia (*Petunia hybrida*), Virginischer Tabak (*Nicotiana tabacum*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Die von dreizehn Laboratorien eingesendeten Ergebnisse zeigen, dass von insgesamt 130 (10×13 , ohne die Probe von Tomaten-DNA) Proben von DNA aus unterschiedlichen Pflanzen mit dem System für die PCR des *LAT52*-Gens 126 negative Ergebnisse erhalten wurden. Demzufolge liegt die Falsch-positiv-Rate des Systems für die PCR des *LAT52*-Gens bei 3,08 % ($4/130$) (siehe Tabelle A.18). Die falsch positiven Ergebnisse können in einer Kontamination im Verlauf der PCR begründet sein. Diese Daten weisen darauf hin, dass das *LAT52*-Gen für den Nachweis von Tomate artspezifisch ist.

Tabelle A.18 — Ergebnisse der qualitativen PCR

Parameter (Ringversuch von 2007)	Wert
Anzahl der Laboratorien	13
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	13
Anzahl der Proben je Laboratorium	22
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	286
Anzahl der Proben, die Tomate enthalten	156
Anzahl der Proben, die keine Tomate enthalten	130
Falsch positive Ergebnisse	4 (3,08 %)
Falsch negative Ergebnisse	1 (0,64 %)

Die LOD des Systems für die PCR von *LAT52* wurde mit qualitativer PCR unter Verwendung eines gemischten Mehls validiert, das Mais und Tomatensaatgut enthielt. Sämtliche der dreizehn Laboratorien konnten die aus dem gemischten Mehl extrahierte DNA-Probe nachweisen, die 0,1 % Massenanteil oder mehr Tomate enthielten, und zwei Laboratorien konnten den Gehalt von 0,01 % Tomate im gemischten Mehl nachweisen. Diese Daten weisen darauf hin, dass die LOD des Systems für die PCR von *LAT52* 0,1 % Massenanteil beträgt (siehe Tabelle A.19).

Tabelle A.19 — Ergebnisse der Prüfung der qualitativen PCR bezüglich der LOD

Parameter (Ringversuch von 2007)	Relative Konzentration ($W_{\text{tomato}}/W_{\text{maize}}$)				
	2 %	0,5 %	0,1 %	0,05 %	0,01 %
Anzahl der Laboratorien	13	13	13	13	13
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	13	13	13	13	13
Anzahl der Proben je Laboratorium	2	2	2	2	2
Anzahl der Proben	26	26	26	26	26
Positive Ergebnisse	25 (96,2 %)	25 (96,2 %)	26 (100 %)	0 (0 %)	2 (15,4 %)

A.6.3.4 Molekulare Spezifität

A.6.3.4.1 Allgemeines

Das *LAT52*-Verfahren ist auf das Tomaten-Gen *LAT52* ausgerichtet, von dem im haploiden Genom verschiedener Tomatensorten stabil eine Einzelkopie vorliegt. Mit den spezifischen Primern (Tabelle A.20) wurde ein Amplifikat mit einer Länge von 92 bp amplifiziert.

A.6.3.4.2 Experimentell

Die aus den elf verschiedenen Pflanzenmaterialien (einschließlich Tomate) extrahierten DNA-Proben wurden vom Verfahrensentwickler mit dem System für die PCR von *LAT52* analysiert. Von den elf Proben führte nur die Tomaten-DNA zu positiven Ergebnissen. Die anderen zehn Proben (siehe A.6.3.3) führten zu negativen Ergebnissen.

Die aus zwölf verschiedenen Tomatensorten extrahierten DNA-Proben wurden vom Verfahrensentwickler mit dem System für die PCR von *LAT52* analysiert (siehe A.6.6). Alle Proben führten zu positiven Ergebnissen.

A.6.3.4.3 Theoretisch

Die theoretische Spezifität des *LAT52*-Primers wurde durch Suche nach Homologien unter Anwendung des Programms BLASTN 2.0MP-WashU [82] (Datum der Recherche: 20. Januar 2010) beurteilt. Die zur Abfrage verwendete 92-bp-Sequenz ist Teil der NCBI-Eintrag-Nummer X15855 (Nukleotide 1385 bis 1476). Die Ergebnisse der BLAST-Recherche bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit der für Staubbeutel von Tomaten spezifischen *LAT52*-Gen-Sequenz und zeigten keine Homologie mit anderen Genen und Arten auf.

A.6.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Diese Methode ist ein qualitatives PCR-Verfahren unter Anwendung des *LAT52*-Gens als artspezifisches Gen von Tomaten zum qualitativen Nachweis von GM- oder Nicht-GM-Tomaten. Der Nachweis des PCR-Produktes mit einer Länge von 92 bp erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

A.6.5 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die Begriffe nach ISO 5725-1 [40] und ISO 24276.

A.6.6 Probenart und -mengen

Im Ringversuch wurden die folgenden Proben verwendet:

- zwölf DNA-Proben aus Saatgut von 12 verschiedenen Tomatensorten, die in verschiedenen Gebieten Chinas häufig angebaut wurden (d. h. Shengnong2, Jifan4, Zhongsu5, Yashu6, Jiafen1, Shenfeng2, Hongza9, Nongyou30, R144, Dongnong704, Lichun und Zaokui), 20 ng/μl, jeweils 50 μl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Heterogenität der *LAT52*-Zielsequenz innerhalb von Tomatensorten verwendet;
- elf DNA-Proben von Tomatensaatgut (Jiafen1) und die Blätter von weiteren zehn Pflanzenmaterialien, die aus stammesgeschichtlicher Sicht mit Tomate verwandt (d. h. Aubergine, Kartoffel, Petunia und Paprika), gewöhnliche GM-Kulturpflanzen (d. h. Mais, Sojabohne, Raps und Reis) oder Modellpflanzen (d. h. Tabak und Ackerschmalwand) sind, 20 ng/μl, jeweils 50 μl. Diese DNA-Proben wurden zur Validierung der Spezifität des *LAT52*-Verfahrens verwendet;
- zehn DNA-Proben von dem gemischten Mehl aus Mais und mit verschiedenen Gehalten an Tomate, 20 ng/μl, jeweils 50 μl. Diese DNA-Proben wurden als Doppelblindproben einer Reihe von fünf Tomaten-Konzentrationen hergestellt und zur Prüfung der LOD des Systems für die PCR von *LAT52* verwendet.

A.6.7 Nachweisgrenze und Anwendungsbereich

Die LOD des Verfahrens betrug etwa 0,1 % Massenanteil des Tomatenmaterials. Das *LAT52*-Verfahren kann für den spezifischen Nachweis und die Identifizierung von Tomatenmaterialien in einer Probe eingesetzt werden.

Mit dem System für die PCR von *LAT52* wurden DNA-Proben analysiert, die aus fünf gemischten Mehlen extrahiert wurden, die unterschiedliche Massenanteile von Material aus Tomatensaatgut enthielten. Nur die Mehlproben mit einem Gehalt von 0,1 % oder darüber (d. h. 2 %, 0,5 % und 0,1 %) führten zu positiven Ergebnissen. Die anderen beiden Proben (d. h. Massenanteile von 0,05 % und 0,01 %) führten zu negativen Ergebnissen.

A.6.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Gesamt(mess)unsicherheit des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe A.6.3.3).

A.6.9 Störungen

Aus den durchgeführten Untersuchungen sind keine zusätzlichen Informationen über Störungen bekannt.

A.6.10 Physikalische und Umgebungsbedingungen

Siehe ISO 24276 zu Einzelheiten.

A.6.11 Geräte und Ausrüstungen

A.6.11.1 Gerät für die Amplifikation der DNA (Thermocycler oder ein gleichwertiges Gerät);

A.6.11.2 Elektrophoresegerät mit Netzanschluss;

A.6.11.3 Dokumentationssystem für die Gel-Analyse;

A.6.11.4 Mikrowellengerät (wahlweise).

A.6.12 Chemikalien und Hilfsstoffe

Wenn nicht anders angegeben, sind nur Chemikalien nach ISO 24276 verwendet worden und Wasser für die Molekularbiologie oder Wasser von vergleichbarer Reinheit.

A.6.12.1 herkömmlicher PCR-Mastermix (siehe A.6.16.2);

A.6.12.2 Oligonukleotide (siehe Tabelle A.20).

A.6.12.3 Beladungspufferlösung

A.6.12.4 Elektrophorese-Pufferlösung

A.6.12.5 Agarose

A.6.12.6 DNA-Größenstandard

A.6.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen sollten bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung sind –20 °C erforderlich.

A.6.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Es muss sichergestellt sein, dass die Untersuchungsprobe für die Laboratoriumsprobe repräsentativ ist, z. B. durch Vermahlen oder Homogenisieren. Die zu berücksichtigenden Maßnahmen und Arbeitsschritte sind in ISO 21571 ausführlich beschrieben.

Die DNA-Proben wurden vom GMDL-SJTU unter Anwendung des CTAB-Verfahrens nach ISO 21571:2005, A.3, extrahiert.

A.6.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte, z. B. Thermocycler und Pipetten, sollten z. B. nach ISO/IEC 17025 [41] kalibriert werden.

A.6.16 Analysenschritte

A.6.16.1 Aufbereitung der DNA für die qualitative PCR

In Bezug auf die Extraktion von DNA aus der Untersuchungsprobe sollten die allgemeinen in ISO 21571 beschriebenen Anweisungen und Maßnahmen eingehalten werden. Es wird empfohlen, eines der in ISO 21571:2005, Anhang A, beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren auszuwählen.

A.6.16.2 Herkömmlicher PCR-Mastermix

Der herkömmliche PCR-Mastermix für die Reaktion enthielt einfach konzentrierte PCR-Pufferlösung, 200 µmol/l von jedem dNTP, jeweils 400 nmol/l des Forward und Reverse Primers und 1 IU Hot-Star-Taq-DNA-Polymerase¹¹⁾.

Tabelle A.20 — Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für die qualitative PCR

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids (5' nach 3')
LAT52-Primer F	A gAC CAC gAg AAC gAT ATT TgC
LAT52-Primer R	TT CTT gCC TTT TCA TAT CCAg ACA

A.6.16.3 Durchführung

Der PCR-Ansatz wurde für ein Gesamtvolumen von 30 µl je Reaktionsgemisch entwickelt. Die Verwendung von 100 ng Matrizen-DNA je Reaktionsgefäß wird empfohlen.

Der für den Versuch benötigte herkömmliche PCR-Mastermix wird aufgetaut, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Die aufgetauten Reagenzien werden bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt.

25 µl/Röhrchen des Mastermixes werden in 200-µl-PCR-Reaktionsröhrchen verteilt. 5 µl der DNA-Probenlösung, entweder der bezüglich Tomate positiven Kontrolle oder der negativen Kontrolle oder der Leerwertkontrolle (H₂O), werden in die Reaktionsröhrchen gegeben.

Der Inhalt der PCR-Röhrchen wird vorsichtig gemischt, die Röhrchen werden kurz in der Mikrozentrifuge zentrifugiert, um alle Tropfen zu vereinen.

Die Platte wird in das Gerät gestellt.

Die PCR wird unter den in A.6.16.5 beschriebenen Bedingungen für die Zyklen der qualitativen PCR durchgeführt.

A.6.16.4 PCR-Kontrollen

Positive und negative Zielkontrollen sollten nach ISO 24276 erfolgen.

A.6.16.5 Temperatur-Zeit-Programm

Der PCR-Assay wurde für die Anwendung in einem PCR-Thermocycler PTC-100¹¹⁾ (MJ Research) und ABI 2720¹¹⁾ (Applied Biosystems) optimiert. Obwohl auch andere PCR-Geräte verwendet werden dürfen, sollten die Einstellwerte des Thermocyclers verifiziert werden. Das Temperatur-Zeit-Programm ist in Tabelle A.21 angeführt.

Tabelle A.21 — Temperatur-Zeit-Programm für die qualitative PCR

Schritt	Stufe		Temperatur °C	Zeit s	Anzahl der Zyklen
1	Aktivierung und initiale Denaturierung		94	900	1
2a	Amplifikation	Denaturierung	94	30	35
2b		Annealing	56	30	
2c		Elongation	72	30	
3	Abschließende Elongation		72	420	1

A.6.16.6 Nachweis

Nach der PCR werden 2 µl Beladungspufferlösung in jedes Reaktionsröhrchen gegeben und mit dem PCR-Produkt gemischt.

Das Elektrophoresegel (30 g/l Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) wird mit jeweils 10 µl von jedem PCR-Produkt beladen.

Der Gellauf wird im Elektrophoresegerät 20 min bei 5 V/cm durchgeführt.

Das Gel wird abgebildet und mit einem geeigneten bildgebenden System für die Gel-Analyse aufgezeichnet.

Aufgrund des kurzen Amplifikats sollte TBE als Pufferlösung für die Elektrophorese verwendet werden.

Das spezifische Produkt sollte ein Fragment von 92 bp sein; das Vorliegen anderer DNA-Fragmente weist auf eine unspezifische Amplifikation hin.

A.6.16.7 Annahme- oder Ablehnungskriterien

In der bezüglich Tomate positiven Kontrolle (Probe P) sollte ein Fragment von 92 bp nachgewiesen werden, in der negativen Kontrolle (Probe N) und in der Leerwertkontrolle sollte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 92 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von *LAT52* enthält und das Ergebnis „positiv“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „negativ“.

A.6.17 Identifizierung der Proben

Ergebnisse von Proben müssen eindeutig als nachgewiesen oder nicht nachgewiesen identifiziert werden.

A.6.18 Auswertung und Berechnung der Ergebnisse

Der Nachweis von Fragmenten mit einer Größe von 92 bp zeigt an, dass die DNA-Probenlösung amplifizierbare DNA von *LAT52* enthält und das Ergebnis „nachgewiesen“ ist; andernfalls ist das Ergebnis „nicht nachgewiesen“.

Das PCR-Produkt mit einer Länge von 92 bp kann mit DNA-Sequenzanalyse verifiziert werden. 

Anhang B (informativ)

Screening-Verfahren

B.1 Screening-Verfahren zum Nachweis gentechnisch modifizierter Pflanzen-DNA (CaMV-35S-Promotor)

B.1.1 Allgemeines

Dies ist ein Verfahren zum Nachweis einer veränderlichen Anzahl von Kopien der DNA-Sequenz des Blumenkohlmosaik-Virus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV)-35S-Promotors. Da der CaMV-35S-Promotor in vielen gentechnisch modifizierten Pflanzen vorhanden ist, darf dieses Verfahren zum Screenen auf das Vorliegen von DNA aus GM-Pflanzen angewendet werden [22], [23].

B.1.2 Validierungsstatus und Leistungskriterien

B.1.2.1 Ringversuch

Das Verfahren wurde in mehreren Ringversuchen mit unterschiedlichen rohen und verarbeiteten Lebensmittelmatrices [24], [25] validiert.

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch [24] unter Koordination des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschlands von der Arbeitsgruppe „Entwicklung von Methoden zum Nachweis mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellter Lebensmittel“ validiert. Die Anzahl der Teilnehmer und die Anzahl der Proben entsprechen den Kriterien nach ISO 5725. Für die DNA-Extraktion wurde das in ISO 21571:2005, A.3, angeführte CTAB-Verfahren (jedoch mit einer Teilprobe von 100 mg) angewendet.

Die Daten des Ringversuchs sind in Tabelle B.1 angegeben.

Tabelle B.1 — Ergebnisse des Ringversuchs

Jahr	1999
Anzahl der Laboratorien	27
Anzahl der Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	23
Anzahl der Proben je Laboratorium	5
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	115
Anzahl der Proben, die GTS 40-3-2 enthalten	59
Anzahl der Proben, die keine GM-Sojabohnen enthalten	56
Falsch positive Ergebnisse	0 (0 %)
Falsch negative Ergebnisse	0 (0 %)

B.1.2.2 Molekulare Spezifität

B.1.2.2.1 Allgemeines

Dieser Anhang erfüllt die in Abschnitt 7 angeführten Anforderungen.

Das Verfahren wurde zur Bestimmung einer Zielsequenz entwickelt, die unter der GenBank® Eintrag-Nummer V00141 beschrieben ist.

Eine Auflistung von gentechnisch modifizierten Pflanzen, die den CaMV-35S-Promotor enthalten, ist im Anhang von [24] angegeben.

Ein falsch positives Ergebnis kann auftreten, weil die amplifizierte Sequenz vom Blumenkohlmosaik-Virus stammt, der Blumenkohl und andere Mitglieder der Familie der *Brassicaceae* (*Cruciferae*, Kreuzblütler) sowie *Resedaceae* (Resedengewächse) und *Solanaceae* (Nachtschattengewächse) infiziert [26], [27].

Positive Ergebnisse, die bei Proben von *Brassicaceae*, *Resedaceae* und *Solanaceae* erhalten wurden, sollten deshalb mit Vorsicht behandelt werden. Positive Ergebnisse können das Vorliegen eines Produktes aus einer GM-Pflanze anzeigen, sollten jedoch nicht ohne zusätzliche Bestätigung als Nachweis für das Vorliegen von Produkten, die aus GM-Pflanzen stammen, interpretiert werden.

Um zwischen einer Virusinfektion und GM-Material zu unterscheiden, können Verfahren zum Nachweis des Blumenkohlmosaik-Virus angewendet werden [6].

B.1.2.2.2 Theoretisch

Bei Datenbankrecherchen (NCBI BlastN® Recherche, EMBL-Datenbank, 28. September 2001) wurde keine Sequenz-Homologie mit DNA-Sequenzen von Nicht-GM-Kulturpflanzen festgestellt. Beide Primer stimmen jedoch mit einem Eintrag überein, der weder dem Blumenkohlmosaik-Virus noch rekombinanten Vektoren oder Patenten zuzuordnen ist: S70105 cp = Hüllprotein (en: coat protein) [Gurkenmosaik-Virus]. Die Primer stimmen auch mit mehr als 100 Einträgen überein, die dem Blumenkohlmosaik-Virus und rekombinanten Vektoren und Patenten zuzuordnen sind.

B.1.2.2.3 Experimentell

Bei Abwesenheit von DNA vom Virus selbst wurde bei DNA aus nicht gentechnisch modifizierten Kulturpflanzen keine Amplifikation festgestellt [22], [24], [25] und [28].

Bei DNA aus vielen gentechnisch modifizierten Pflanzen, z. B. GTS 40-3-2 (Roundup Ready®-Sojabohnen), den Maislinien Event 176 (Bt 176), Bt 11, MON 810, MON 809 und Tomaten mit verzögerter Reifung (Zeneca) [22], [24], [25] und [28], wurde eine Amplifikation beobachtet.

Die Anzahl der Kopien der DNA-Sequenz sind veränderlich.

B.1.2.3 Nachweisgrenze (LOD)

Die absolute LOD wurde nicht bestimmt. Eine relative LOD von 0,1 % gentechnisch modifizierte Sojabohnen in Sojamehl IRMM-410 und von 0,1 % gentechnisch modifizierter Mais Event 176 (Bt 176) IRMM-411 in Maismehl [Massenanteil] (zertifizierte Referenzmaterialien, CRMs) wurde nachgewiesen [25].

B.1.3 Anpassung

Es sind keine besonderen Angaben vorhanden.