

DIN EN ISO 21570

ICS 67.050

Ersatz für
DIN EN ISO 21570:2006-02 und
DIN EN ISO 21570
Berichtigung 1:2007-06

**Lebensmittel –
Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen
und ihren Produkten –
Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren
(ISO 21570:2005 + Cor 1:2006 + Amd 1:2013);
Deutsche Fassung EN ISO 21570:2005 + AC:2007 + A1:2013**

Foodstuffs –

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

Quantitative nucleic acid based methods (ISO 21570:2005 + Cor 1:2006 + Amd 1:2013);

German version EN ISO 21570:2005 + AC:2007 + A1:2013

Produits alimentaires –

Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés –

Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques

(ISO 21570:2005 + Cor 1:2006 + Amd 1:2013);

Version allemande EN ISO 21570:2005 + AC:2007 + A1:2013

Gesamtumfang 138 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21570:2005 + 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 2013-04-11 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 im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 21569	siehe	DIN EN ISO 21569
ISO 21571	siehe	DIN EN ISO 21571
ISO 24276	siehe	DIN EN ISO 24276

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 21570:2006-02 und DIN EN ISO 21570 Berichtigung 1:2007-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Verweisung auf die ISO 24276:2006 wurde aktualisiert;
- b) die Angaben zur Auswertung in Abschnitt 8 (insbesondere zu nicht eindeutigen Ergebnissen) wurden neu formuliert;
- c) die Festlegungen zu den Angaben der Ergebnisse in Abschnitt 9 wurden neu formuliert;
- d) die Angaben zum Untersuchungsbericht in Abschnitt 10 wurden neu formuliert;
- e) insgesamt wurden zwei neue Verfahren in die informativen Anhänge als A.2 und A.3 aufgenommen;
- f) das gesamte Dokument wurde redaktionell (Fußnoten) angeglichen;
- g) das Literaturverzeichnis wurde ergänzt.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 21570: 2006-02
DIN EN ISO 21570 Berichtigung 1: 2007-06

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 21569 *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

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

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

— Leerseite —

ICS 67.050

Deutsche Fassung

**Lebensmittel —
Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten
Organismen und ihren Produkten —
Quantitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren
(ISO 21570:2005 + Cor 1:2006 + Amd 1:2013)**

Foodstuffs —
Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products —
Quantitative nucleic acid based methods
(ISO 21570:2005 + Cor 1:2006 + Amd 1:2013)

Produits alimentaires —
Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement
modifiés et des produits dérivés —
Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques
(ISO 21570:2005 + Cor 1:2006 + Amd 1:2013)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 16. Oktober 2005, die Berichtigung am 14. Februar 2007 und die Änderung A1 am 11. April 2013 angenommen.

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

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

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, 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	3
[A1] Vorwort der Änderung A1 [A1]	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	7
6 Geräte.....	7
7 Verfahrensanleitungen	7
8 [A1] Auswertung.....	9
9 Angabe der Ergebnisse.....	10
10 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren.....	12
A.1 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zur absoluten quantitativen Bestimmung von DNA des <i>adh1</i> -Gens von Mais mit Real-Time PCR	12
A.2 [A1] Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt	18
A.3 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	26
Anhang B (informativ) Screening-Verfahren	34
B.1 Screening-Verfahren zur relativen quantitativen Bestimmung der 35S-Promotor-DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 mit Real-Time PCR.....	34
Anhang C (informativ) Konstrukt-spezifische Verfahren	42
C.1 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 mit Real-Time PCR (Verfahren 1)	42
C.2 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 mit Real-Time PCR (Verfahren 2)	49
C.3 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA von Bt 176–Mais mit Real-Time PCR.....	59
C.4 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 mit Real-Time PCR.....	67
C.5 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie MON 810 mit Real-Time PCR	75
C.6 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie Bt 176 mit Real-Time PCR.....	83
C.7 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie Bt11 mit Real-Time PCR.....	92
C.8 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie GA21 mit Real-Time PCR	100
C.9 Konstrukt-spezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie T25 mit Real-Time PCR	108
Anhang D (informativ) Transformationsereignisspezifische (event-spezifische) Verfahren	116
D.1 Event-spezifisches Verfahren zur absoluten und relativen quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie Bt11 mit Real-Time PCR	116
D.2 Event-spezifisches Verfahren zur relativen quantitativen Bestimmung von DNA der Maislinie MON 810 mit Real-Time PCR.....	124
Literaturhinweise	131

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21570:2005) 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 Mai 2006, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2006 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.

▣^{A1} Vorwort der Änderung A1 ▣^{A1}

▣^{A1} Dieses Dokument (EN ISO 21570:2005/A1:2013) 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 21570:2005/Amd 1:2013 wurde vom CEN als EN ISO 21570:2005/A1:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. ▣^{A1}

Einleitung

Die Überprüfung von Zutaten auf gentechnische Veränderungen wird nach folgenden sukzessiven oder parallelen Schritten durchgeführt. Nach der Probenahme werden die Nukleinsäuren aus der Untersuchungsprobe 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. PCR) unterzogen. Diese Schritte werden ausführlich in der vorliegenden Norm und in folgenden Internationalen Normen behandelt:

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

ISO 21570, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods*

Weitere Angaben zu Definitionen und allgemeinen Gesichtspunkten zu allen oben angeführten Schritten sind zusammengefasst in:

ISO 24276, *Foodstuffs — Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

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

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

ISO wurde darüber informiert, dass Applied Biosystems, Roche Molecular Systems Inc. und Hoffmann-La Roche Patentrechte betreffend der PCR-Technologie innehaben. Diese Firmen haben bei der ISO bestätigt, dass sie bereit sind, mit Antragstellern in der ganzen Welt über Lizenzen zu verhandeln, und zwar unter vernünftigen und nicht diskriminierenden Bedingungen. In diesem Zusammenhang sind die Erklärungen der Patentinhaber bei ISO registriert. Informationen können erhalten werden von:

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 der Elemente dieses Dokuments andere Patentrechte berühren können als die vorstehend angeführten. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm liefert den Gesamtrahmen für die quantitativen Verfahren zum Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in Lebensmitteln mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Sie legt allgemeine Anforderungen an die spezifische Amplifikation von DNA-Zielsequenzen zur Quantifizierung des relativen DNA-Gehaltes an GVO und zur Bestätigung der Identität der amplifizierten DNA-Sequenz fest.

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 Lebensmittelmatriices erarbeitet, ist jedoch auch auf andere Matriices anwendbar, z. B. Futtermittel und aus der Umwelt entnommene Pflanzenproben.

In den Anhängen A bis D sind spezifische Beispiele von Verfahren 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 21569:2005  +AM1:2013 , *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods*

ISO 21571  :2005+AM1:2013 , *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*

ISO 24276:  2006+AM1:2013 , *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

ISO Guide 32, *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials*

3 Begriffe

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

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Die quantitative Analyse besteht aus der quantitativen Bestimmung von DNA-Zielsequenzen in den Untersuchungsproben. Jedes Verfahren dient der Bestimmung der Zielsequenz(en).

Die quantitative Bestimmung darf mit kompetitiver PCR [1], [2] oder Real-Time PCR [3], [4] erfolgen.

Eine quantitative Analyse sollte eindeutig die Menge des gentechnischen Zielelements, bezogen auf die Menge einer spezifischen Referenz, geeigneten Kalibriersubstanzen und Kontrollen angeben und sollte dabei innerhalb des dynamischen Bereiches des angewendeten analytischen Verfahrens und der analysierten Untersuchungsprobe sein.

Die Analyse umfasst im Allgemeinen:

- die Amplifikation einer oder mehrerer spezifischer Zielsequenzen,
- den Nachweis und die Bestätigung der Spezifität des (der) Amplifikats (Amplifikate) und
- die quantitative Bestimmung der amplifizierten Fragmente in Bezug auf Kalibriersubstanzen.

ANMERKUNG Im Fall von Real-Time PCR-Analyse erfolgen Amplifikation, Nachweis und Bestätigung gleichzeitig.

4.2 Amplifikation, Nachweis und Bestätigung von Amplifikaten

Das Prinzip der Amplifikation, des Nachweises und der Bestätigung von DNA-Sequenzen ist in ISO 21569 beschrieben.

4.3 Quantitative Bestimmung von Amplifikaten

Das Prinzip der quantitativen Bestimmung besteht üblicherweise in der Ermittlung des Verhältnisses (angegeben in Prozent) von zwei DNA-Zielsequenzen, d. h., von einer für den interessierenden gentechnisch veränderten Organismus spezifischen und die andere für die taxon-spezifische (endogene) Zielsequenz. In einigen Fällen kann jedoch die quantitative Bestimmung in Bezug auf eine bestimmte Menge an Lebensmittelmatrix erfolgen (z. B. beim Nachweis von gentechnisch veränderten (gv) Mikroorganismen in Lebensmitteln).

Bei der quantitativen Bestimmung verwendete Kalibriersubstanzen (Kalibriermaterialien) sollten auf zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM) zurückführbar sein, falls diese zur Verfügung stehen. Wenn keine zertifizierten Referenzmaterialien verfügbar sind, sollten andere geeignete Referenzmaterialien (RM) verwendet werden. Eine Beispielanleitung ist in [5] angegeben. Informationen zu Validierungsstudien und Messunsicherheit wurden im Rahmen von internationalen Studien erarbeitet [6], [7], [8], [9].

5 Reagenzien

Sämtliche bei der Analyse verwendeten Reagenzien und Materialien sollten identisch oder gleichartig denen sein, die im Verfahren festgelegt sind. Andernfalls sollten sämtliche Reagenzien und Materialien für die Molekularbiologie geeignet sein. Diese Reagenzien müssen nach den Empfehlungen des Lieferanten oder entsprechend den Festlegungen des Laboratoriums zur Qualitätssicherung aufbewahrt und verwendet werden. Die Reagenzien sind in den spezifischen Anhängen dieser Norm aufgelistet.

6 Geräte

Siehe die Anhänge A bis D und ISO 24276.

7 Verfahrensanleitungen

7.1 Allgemeines

Allgemeine Betrachtungen in Bezug auf die PCR-Amplifikation zum Nachweis von GVOs sind in ISO 21569 beschrieben.

In den Anhängen A bis D sind PCR-Nachweisverfahren zusammen mit Einzelheiten zu deren Anwendungsbereich festgelegt. Die nachgewiesenen Leistungsmerkmale sind für jedes Verfahren dargelegt.

Die Konzentration der interessierenden DNA-Sequenz sollte im dynamischen Bereich des Verfahrens liegen.

ANMERKUNG Ein für die taxon-spezifische Zielsequenz spezifischer Monitorlauf kann durchgeführt werden, um festzustellen, ob die Proben-DNA in ausreichender Qualität (Länge und strukturelle Unversehrtheit), Reinheit und Menge für den Nachweis und die quantitative Bestimmung eines GVO vorhanden ist, der zu dieser taxonomischen Zielgruppe gehört. Das kann dann von besonderer Bedeutung sein, wenn DNA aus zusammengesetzten oder hochverarbeiteten Lebensmittelmatrices extrahiert wird.

Die aus jeder Untersuchungsprobe extrahierte DNA sollte mindestens durch eine Doppelbestimmung analysiert werden.

Geeignete Kontrollen müssen mitgeführt werden (siehe ISO 24276:  2006 , Tabelle 1).

7.2 Stabilität der Zielsequenz

Die Stabilität hinsichtlich der Allele und der Anzahl der Kopien der Zielsequenz sollte bei allen Sorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft berücksichtigt werden.

7.3 Kalibrierung der Analyse

Eine geeignete Anzahl an Kalibrierpunkten und Wiederholungen, die den Bereich der quantitativen Bestimmung umfassen, muss verwendet werden (z. B. vier Kalibrierpunkte mit zwei Wiederholungen [insgesamt 4×2 Werte] oder sechs Kalibrierpunkte mit einer Messung an jedem Punkt [insgesamt 6 Werte]). Die Qualität der Kalibrierung beeinflusst die Messunsicherheit [9].

Als Alternative zu genomischer DNA als Referenzmaterial für die Kalibrierung darf eine Verdünnungsreihe eines Plasmids oder einer synthetischen dsDNA, die die Zielsequenz enthält, verwendet werden, vorausgesetzt, es ist nachgewiesen, dass sie sich genauso verhält wie Referenzmaterial aus genomischer DNA und die genomische DNA, die aus der Probe extrahiert wurde.

7.4 Betrachtungen zur quantitativen Bestimmung

PCR-Verfahren sollten so ausgelegt sein, dass die Variabilität auf ein Minimum verringert wird.

ANMERKUNG In Abhängigkeit vom angewendeten Verfahren und/oder untersuchten Material kann das Vorliegen von Genen für eine Kombination von Insekten- und Herbizidresistenz (stacked genes) zu einer Überschätzung des wahren GVO-Gehaltes führen.

Hinsichtlich der Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ) siehe ISO 24276.

Die Bestimmung des GVO-Gehaltes auf der Grundlage der Kopiezahlen von Zielsequenzen je haploidem Genom wird durch Homo- und Heterozygotie der zu untersuchenden Arten beeinflusst. Einzelheiten siehe in den Anhängen A bis D.

Die Anwendung des $\Delta\Delta C_t$ -Verfahrens (Schwellenwert-Zyklus) ist nur gültig, wenn die Effizienz der Amplifikation des für die taxonomische Zielgruppe spezifischen und des GVO-spezifischen Assays sehr ähnlich sind.

7.5 Anforderungen an die Qualitätssicherung

Die Übereinstimmung zwischen Messungen ist anzustreben, um zuverlässige Schätzwerte von Zielsequenzmengen zu erhalten. Um festzustellen, ob die Messwerte übereinstimmen, muss jedoch die relative Standardabweichung der Wiederholpräzision RSD_r bekannt sein (für Details, siehe die Reihe ISO 5725). Die zur Berechnung der relativen Standardabweichung der Wiederholpräzision benötigte Anzahl an Einzelmessungen je Laboratoriumsprobe übersteigt möglicherweise den realisierbaren Aufwand, der in der Praxis bezüglich der Kosten akzeptabel ist. Demzufolge sollte, wenn eine bestimmte, von einem GVO stammende DNA als prozentualer Anteil anzugeben ist, eine praktisch durchführbare Lösung mindestens verlangen:

- a) Übereinstimmung innerhalb einer Untersuchungsprobe durch
 - Zurückweisung von Messwerten $< LOQ$ und
 - maximale zwischen den Verdünnungen und einzelnen Messwerten beobachtete Abweichung entspricht dem für den entsprechenden Verdünnungsfaktor erwarteten Wert $\pm 33 \%$.

b) Übereinstimmung zwischen Untersuchungsproben durch

- die unter a) erhaltenen Werte der geschätzten relativen Konzentrationen von gv DNA für jede Untersuchungsprobe sollten sich nicht mehr als –50 % bis +100 % von dem geschätzten Wert für die Menge (gleich einem ΔC_t -Wert von 1 bei der Real-Time PCR) unterscheiden [d. h. bei zwei Untersuchungsproben sind Messwerte von 1,0 % und 2,0 % annehmbar, Messwerte von 0,9 % und 2,1 % nicht].

Zur Sicherstellung der Genauigkeit der Messungen muss ein Referenzmaterial (RM), vorzugsweise ein für die Menge des betreffenden Transformationsereignisses zertifiziertes Referenzmaterial (ZRM), mit einem geeigneten Grad an metrologischer Zuverlässigkeit und mit angemessener Ähnlichkeit der Matrix, ausgewählt und analysiert werden. Wenn keine ZRM zu Verfügung stehen, darf laboratoriumsinternes Referenzmaterial nach einem Verfahren hergestellt werden, mit dem Stabilität, Homogenität und Rückverfolgbarkeit nachgewiesen werden können und das das Fehlen einer systematischen Abweichung sicherstellt. Die quantifizierte Unsicherheit muss der geforderten Unsicherheit für die Kalibrierung entsprechen [siehe ISO Guide 32].

8 Auswertung

Das PCR-Ergebnis ist entweder a) oder b).

c) geeignet für die quantitative Bestimmung der Zielsequenz, vorausgesetzt:

- das Ergebnis ist positiv nach ISO 21569:2005, 8.1;
- die Inhibition der Reaktion, die beobachtet werden kann, ist vernachlässigbar;
- die Analyse führt zu einem eindeutigen Messwert;
- der Gehalt an Zielsequenz liegt im dynamischen Bereich des Verfahrens;
- es liegt eine annehmbare Kalibrierung für die Analyse vor (siehe 7.3) oder:

d) nicht geeignet für die quantitative Bestimmung der Zielsequenz, wenn eine der in a) angeführten Bedingungen nicht erfüllt ist.

Auswertung von nicht eindeutigen Ergebnissen innerhalb derselben Einwaage: 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.

Auswertung von nicht eindeutigen Ergebnissen zwischen zwei Einwaagen: Wenn die Ergebnisse für die beiden Einwaagen einer Probe „+/-“ lauten, muss die Extraktion und Analyse von zwei neuen Einwaagen durchgeführt werden. Wenn die Ergebnisse erneut „+/-“ lauten, wird die Probe als negativ nach ISO 24276:2006, 6.3, angesehen.

Die Messunsicherheit muss hinreichend klein sein, um dem Laboratorium zu ermöglichen, die entsprechenden Schlussfolgerungen zu ziehen.

In den Anhängen A bis D ist die Messung der Mengen an Ziel-DNA beschrieben. Diese Mengen können zur Berechnung des GVO-Gehaltes verwendet werden. Bei diesen Berechnungen werden gewöhnlich relevante biologische Faktoren berücksichtigt, wie z. B. die Homo- oder Heterozygotie der Zielsequenzen.

Wenn der Gehalt an gv Zielsequenz oder taxon-spezifischer Zielsequenz unterhalb der Bestimmungsgrenze liegt, darf das Ergebnis nur qualitativ angegeben werden.

ANMERKUNG Ein Ergebnis wird als qualitativ angesehen, wenn der Ergebnisbericht feststellt, dass der von einem GVO stammende Gehalt an DNA unterhalb der praktischen LOQ liegt, und die dazugehörige LOQ-Spezifikation angegeben wird.

9 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse müssen eindeutig die Menge an gv Zielsequenz in Bezug auf die für die taxonomische Zielgruppe spezifische Sequenz angeben. Die Ergebnisse sollten auch Werte für die Messunsicherheit enthalten, wie z. B. die Standardabweichung oder den Variationskoeffizienten (die relative Standardabweichung). Außerdem sollten die LOD und LOQ des Verfahrens sowie die praktische LOD und LOQ im Untersuchungsbericht angegeben werden. Im Untersuchungsbericht sollte darauf hingewiesen werden, dass sich das Ergebnis nur auf die gv Zielorganismen bezieht. Bei quantitativen Screeninganalysen an komplexen Matrices wird empfohlen zu konkretisieren, dass das GVO-Signal von taxonomischen Nicht-Zielgruppen stammen kann.

Die Zielsequenzen können nachgewiesen werden oder nicht, oder die Menge von mindestens einer der Zielsequenzen kann unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. In Tabelle 1 sind die vier alternativen Fälle und die entsprechende Angabe des in den Untersuchungsbericht zu übernehmenden Ergebnisses beschrieben.

Unter Berücksichtigung der Messunsicherheit darf der aus dem GVO stammende DNA-Gehalt auch als ober- oder unterhalb eines bestimmten Wertes liegend angegeben werden.

Tabelle 1 — Angabe der Ergebnisse

Ergebnis	Angabe des Ergebnisses
Für die taxonomische Zielgruppe wurde keine spezifische Sequenz nachgewiesen.	„Von der Spezies x wurde keine DNA nachgewiesen.“
Für die taxonomische Zielgruppe wurde eine spezifische Sequenz, jedoch keine gv Zielsequenz nachgewiesen.	Nach ISO 21569. „Bei der Probe X wurde keine gv Zielsequenz Y nachgewiesen. Die LOD des Verfahrens ist x %, bestimmt mit ABC (Angaben zum Referenzmaterial).“ Wenn nicht nachgewiesen werden kann, dass der Umfang der Untersuchungsprobe und die Menge an Ziel-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 Spezies X extrahierten Ziel-DNA war jedoch möglicherweise/war jedoch ungenügend, um die LOD auf diese Probe anwenden zu können. Die LOD der Probe ist x % (Angabe der verwendeten Einheit).“ ANMERKUNG Die LOD der Probe wird bestimmt durch die Menge an DNA der Spezies, die untersucht wird (Anzahl der Kopien) und das Verhältnis relativ zur absoluten LOD der gv-Zielsequenz (Anzahl der Kopien) und im Fall von Körnern und Samen durch die Anzahl von Körnern oder Samen im vermahlenden Anteil.
Die für die taxonomische Zielgruppe spezifische Sequenz und die gv Zielsequenz wurden beide nachgewiesen, jedoch liegt die Menge von mindestens einer der beiden Zielsequenzen unterhalb der LOQ.	Für jeden GVO ist anzugeben: „Aus dem GVO (Angabe des GVO) stammende DNA, bestimmt durch Nachweis von (Angabe der Zielsequenz) aus (Angabe der Spezies), wurde unterhalb der praktischen Bestimmungsgrenze nachgewiesen.“ Und zusätzlich, wenn zutreffend: „Die praktische Bestimmungsgrenze ist x %.“ (Angabe der verwendeten Einheit).
Die für die taxonomische Zielgruppe spezifische Sequenz und die gv Zielsequenz wurden beide nachgewiesen und die Menge liegt bei beiden Zielsequenzen oberhalb der LOQ.	Für jeden GVO ist anzugeben: „Der von dem GVO (Angabe des GVO) stammende DNA-Gehalt, bestimmt durch Nachweis von (Angabe der Zielsequenz) aus (Angabe der Spezies), ist $x \pm u_{\text{Mess}}$ %“ Dabei ist u_{Mess} die Messunsicherheit. (Angabe der verwendeten Einheit).

10 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss nach ISO 24276 und ISO 21569 erstellt werden und mindestens die folgenden zusätzlichen Angaben enthalten:

- a) die LOQ des Verfahrens und die zur Ermittlung des Wertes verwendete Matrix;
- b) die praktische LOQ;
- c) eine Verweisung auf das zur DNA-Extraktion angewendete Verfahren;
- d) eine Verweisung auf die zur Amplifikation der DNA-Zielsequenzen angewendeten Verfahren;
- e) das verwendete Referenzmaterial;
- f) die Ergebnisse, angegeben nach Abschnitt 9;
- g) das PCR-Zielelement und ob es als „event-spezifisch“, „konstrukt-spezifisch“ oder „für Screeningzwecke“ angesehen wird;
- h) die Definition der angewendeten Messunsicherheit.

ANMERKUNG Die Angaben für g) und h) können in verschiedenen Dokumenten (z. B. Vertragsüberprüfung, technische Datenblätter) aufgeführt sein.



Anhang A (informativ)

Für die taxonomische Zielgruppe spezifische Verfahren

A.1 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zur absoluten quantitativen Bestimmung von DNA des *adh1*-Gens von Mais mit Real-Time PCR

A.1.1 Einleitung

Dieser Anhang beschreibt ein Verfahren zur spezifischen Amplifikation und zur quantitativen Bestimmung des taxon-spezifischen (organismuseigenen) *adh1*-Gens (kodiert die Alkoholdehydrogenase 1) von Mais (*Zea mays*) zur Bestimmung der Menge an Mais-DNA oder zur Untersuchung auf Anwesenheit/Abwesenheit von nachweisbaren PCR-Inhibitoren in DNA-Lösungen, die aus Produkten extrahiert wurden, die von Mais stammende DNA enthalten, z. B. Lebensmittel.

Hinsichtlich der Einschränkungen siehe A.1.8.

A.1.2 Validierungsstatus und Leistungsmerkmale

A.1.2.1 Allgemeines

Die Optimierung des Verfahrens erfolgte für DNA, die aus reinen gemahlten Maiskörnern, Maisblättern und zertifizierten Referenzmaterialien (IRMM-411-, IRMM-412-, IRMM-413-Reihe [10]) extrahiert wurde [11].

Die Vergleichspräzision des beschriebenen Verfahrens wurden in einem Ringversuch mit unbekannten Proben (U1 bis U6) geprüft, die aus Wildtyp Mais-DNA mit einer entsprechend unterschiedlichen Anzahl an Kopien der Zielsequenz (siehe A.1.2.2) bestehen, und in anderen Ringversuchen in Kombination mit ereignisspezifischen Verfahren für gv Mais, z. B. Bt11 (siehe D.1).

Die Anzahl der Kopien der Zielsequenz je haploides Genom wurde auf eins geschätzt [11].

Die Stabilität hinsichtlich der Allele der Zielsequenz wurde ermittelt [11].

A.1.2.2 Ringversuch

Das Verfahren wurde in einem Ringversuch validiert, der von der Gemeinsamen Forschungsstelle der Europäischen Kommission (European Commissions Joint Research Centre (EC-JRC)), Institute for Health and Consumer Protection (Institut für Gesundheits- und Verbraucherschutz) (IHCP) in Übereinstimmung mit der international harmonisierten Vorschrift [12] organisiert wurde.

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve für die quantitative Bestimmung von haploiden Maisgenomen in unbekannten Proben wurden sechs Proben (S1 bis S6) von Wildtyp Mais-DNA (extrahiert aus Blattmaterial [13]), die eine bekannte absolute Anzahl an Kopien (183 486, 61 162, 20 387, 6 796, 2 265, 755) von haploiden Maisgenomen enthielten, verwendet. Die absoluten Kopiezahlen in den bekannten Proben wurden bestimmt, indem die Masse der Proben-DNA (ermittelt durch fluorimetrische quantitative Bestimmung von dsDNA mit PicoGreen, Molecular Probes, Katalog-Nr. P-7589) durch den veröffentlichten mittleren 1-C-Wert für Maisgenome (2,725 pg) dividiert wurde [14].

Als unbekannte Proben wurden sechs Proben (U1 bis U6) von Wildtyp Mais-DNA (extrahiert aus Blattmaterial [13]) verwendet. Die erwartete Kopiezahlen in den unbekannten Proben wurden auf dieselbe Weise bestimmt wie die der bekannten Proben.

Die Ergebnisse der Validierung in einem Ringversuch sind in Tabelle A.1 zusammengefasst.

Das Verfahren wurde auch in Kombination mit transformationsereignisspezifischen Verfahren für mehrere gv Maislinien validiert, z. B. für Bt11 Zuckermais. Siehe [15], [16] und D.1 zu Einzelheiten des kombinierten Ringversuchs (relative quantitative Bestimmung).

Tabelle A.1 — Validierungsdaten

	Probe					
	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Anzahl der teilnehmenden Laboratorien	12	12	12	12	12	12
Anzahl der Laboratorien mit vorliegenden Ergebnissen	10	10	10	10	10	10
Anzahl der ausgeschlossenen Laboratorien	1	1	1	1	1	1
Anzahl der verbliebenen Laboratorien	9	9	9	9	9	9
Anzahl der Proben je Laboratorium	4	4	4	4	4	4
Anzahl der Ausreißer nach Cochran	1	1	1	1	–	–
Anzahl der Ausreißer nach Grubbs	–	1	1	1	1	1
Anzahl der angenommenen Proben	35	34	34	34	35	35
Erwartete Kopiezahl	7 339	18 349	36 697	55 046	91 743	146 788
Mittlere Kopiezahl	9 985	23 885	46 918	75 161	100 541	122 080
Systematische Abweichung des wahren Wertes (%)	36,1	30,2	27,9	36,5	9,6	– 16,8
Wiederholstandardabweichung s_r^a	1 318,59	1 463,60	5 796,58	4 539,57	11 306,89	14 843,41
Relative Wiederholstandardabweichung RSD_r (%) ^b	13,21	6,13	12,35	6,04	11,25	12,16
Vergleichstandardabweichung s_R^a	2 013,12	2 083,57	6 145,39	6 806,85	14 592,04	17 777,70
Relative Vergleichstandardabweichung RSD_R (%) ^b	20,16	8,72	13,10	9,06	14,51	14,56
^a s_r und s_R sind als Kopiezahl angegeben. ^b RSD_r und RSD_R sind als prozentualer Anteil des zugehörigen Mittelwertes angegeben.						

A.1.2.3 Molekulare Spezifität

A.1.2.3.1 Allgemeines

Das Verfahren wurde zur Bestimmung eines Teils der Zielsequenz entwickelt, die unter der EMBL/GenBank/DBJ–Zugangsnummer X04050²⁾ beschrieben ist. Diese Sequenz ist einzigartig für *Zea mays* (Mais) und *Zea mays* subsp. *diploperennis* (Teosinte) [11].

²⁾ Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

A.1.2.3.2 Theoretische Spezifität

Die Spezifität der Primer und Sonden wurde durch eine Recherche der Datenbanken GenBank/EMBL/DDBJ³⁾ theoretisch ermittelt, wobei die Nukleotidsequenzen als zu suchende Sequenzen in dem BLASTN-Programm³⁾ unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> [9. Oktober 2003] verwendet wurden. Das Ergebnis der Recherche bestätigte eine vollständige Übereinstimmung ausschließlich mit den erwarteten Zielsequenzen.

A.1.2.3.3 Experimentelle Bestimmung der Spezifität

Die Spezifität des Verfahrens wurde gegen einen breiten Bereich von taxonomischen Nicht-Zielgruppen und 20 unterschiedliche Maislinien, die eine Probe mit großer geographischer und phylogenetischer Breite darstellen, untersucht [11]. Mit den taxonomischen Nicht-Zielgruppen (mit Ausnahme von Teosinte *Zea mays* subsp. *diploperennis*, der Wildform von Kulturmais) wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet [11], [17]. Die Stabilität hinsichtlich der Kopiezahl und der Allele der Zielsequenz aus unterschiedlichen Maislinien wurde festgestellt [11].

A.1.2.4 Optimierung

Die Optimierung erfolgte für das ABI PRISM®7700 Sequence Detection System³⁾ (SDS) (Applied Biosystems) mit der TaqMan®-Chemie³⁾. Für das Primer- und Sondendesign wurde die Primer Express® Software (Applied Biosystems)³⁾ verwendet.

A.1.2.5 Nachweisgrenze (LOD)

Nach Angaben des Verfahrensentwicklers beträgt die absolute LOD 10 Kopien der Zielsequenz [11].

Die geringste im Ringversuch enthaltene Kopiezahl der Zielsequenz betrug 7 399 Kopien der Zielsequenz.

A.1.2.6 Bestimmungsgrenze (LOQ)

Nach Angaben des Verfahrensentwicklers beträgt die absolute LOQ 100 Kopien der Zielsequenz [11].

Die geringste im Ringversuch enthaltene Kopiezahl der Zielsequenz betrug 7 399.

A.1.3 Anpassung

Es liegen keine besonderen Angaben vor.

A.1.4 Kurzbeschreibung

Ein 134 bp Fragment des *adh1*-Gens wird mit zwei Mais-*adh1*-spezifischen Primern amplifiziert (siehe Tabelle A.2). Die Anreicherung von Amplifikaten wird am Ende jedes PCR-Zyklus (Echtzeit) mit einer Mais-*adh1*-spezifischen Oligonukleotid-Sonde (ADH1-MDO, siehe Tabelle A.2) gemessen, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist: FAM als Reporter-Farbstoff und TAMRA als Quencher. Zu diesem Zweck wurde TaqMan®-Chemie³⁾ eingesetzt.

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

Das gemessene Fluoreszenzsignal überschreitet nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen einen vom Anwender festgelegten Schwellenwert. Diese Anzahl wird C_t -Wert genannt. Zur quantitativen Bestimmung der Menge an Mais-*adh1*-DNA in einer unbekannten Probe wird der C_t -Wert durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve, deren C_t -Werte direkt mit bekannten Kopiezahlen korrelieren (Regressionsanalyse), in einen entsprechenden Wert der Kopiezahl umgewandelt.

A.1.5 Reagenzien

A.1.5.1 Allgemeines

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 24276:  2006 , 6.6.

A.1.5.2 Wasser

A.1.5.3 PCR-Pufferlösung (ohne $MgCl_2$), 10fach

A.1.5.4 $MgCl_2$ -Lösung, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$

A.1.5.5 dNTP-Lösung, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (jeweils)

A.1.5.6 Oligonukleotide

Einzelheiten zu den Oligonukleotiden sind in Tabelle A.2 aufgeführt.

Tabelle A.2 — Oligonukleotide

Name	DNA-Sequenzen der Oligonukleotide	Endkonzentration in der PCR
ADH-FF3	5'—CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC—3'	300 nmol/l
ADH-RR4	5'—CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC—3'	300 nmol/l
ADH1-MDO	5'— <i>FAM</i> ^a -AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCA- <i>TAMRA</i> —3' ^a	200 nmol/l
^a FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin		

Die Länge des *adh1*-Amplifikats beträgt 134 bp.

A.1.5.7 Thermostabile DNA-Polymerase

AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase⁴⁾

A.1.5.8 Uracil-N-Glykosylase (optional)

A.1.5.9 Reaktionsansatz für die Amplifikation

Einzelheiten zum Reaktionsansatz für die Amplifikation sind in Tabelle A.3 aufgeführt.

4) Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Tabelle A.3 — Reaktionsansatz für die Amplifikation, Endvolumen/Konzentration im Reaktionsgefäß

Gesamtes Reaktionsvolumen		25 µl
Proben-DNA (höchstens 250 ng)		5 µl
Taq-DNA-Polymerase	TaqMan® Universal Master Mix, 2fach ⁵⁾	12,5 µl (1fach)
Dekontaminierungssystem (dUTP einschließlich Uracil-N-Glykosylase)		
Reaktionspufferlösung (enthält passive Referenz-ROX) ^a		
dNTP-Mischung		
Primer	(siehe Tabelle A.2)	(siehe A.1.5.6)
Sonde	(siehe Tabelle A.2)	(siehe A.1.5.6)
^a ROX = Carboxy-X-rhodamin		

A.1.6 Geräte

A.1.6.1 Allgemeines

Soweit nicht anders festgelegt, sollte durchgängig die übliche Laborausrüstung angewendet werden.

A.1.6.2 Thermocycler

Das angegebene Temperatur-Zeit-Profil wurde ursprünglich mit ABI PRISM® 7700 SDS (Applied Biosystems)⁵⁾ geprüft. Nach Anpassung der Reaktionsbedingungen dürfen andere Real-Time PCR-Nachweissysteme verwendet werden.

A.1.6.3 Reaktionsgefäße

Die Reaktionsgefäße müssen für die PCR-Amplifikation mit einem Real Time-Thermocycler geeignet sein, wie z. B. ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate, MicroAmp® Optical Caps (8 caps/strip, flat) (Applied Biosystems)⁵⁾.

A.1.7 Durchführung: PCR-Ansatz

A.1.7.1 Allgemeines

Die PCR-Ansätze für die Zielsequenz des Referenzgens und die GVO-Zielsequenz sollten in verschiedenen Reaktionsgefäßen angesetzt werden, sofern es im betreffenden, für die gv Zielsequenz spezifischen Anhang nicht anders festgelegt ist.

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen je PCR-Ansatz von 25 µl mit den in Tabelle A.3 angegebenen Reagenzien.

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

A.1.7.2 PCR-Kontrollen

Wenn die Kontrollen nicht zu den erwarteten Ergebnissen führen, sind die Untersuchungsergebnisse zu verwerfen und die Analyse ist zu wiederholen.

Als eine positive Kontrolle/ein Referenzmaterial für die Kalibrierung darf reine genomische DNA von hoher Qualität, extrahiert aus Mais (z. B. ein ZRM von JRC, IRMM⁶⁾), verwendet werden [13]. Alle weiteren geeigneten Kontrollen sollten, wie in ISO 24276 beschrieben, einbezogen werden.

A.1.7.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle A.4 angegebene Temperatur-Zeit-Programm wurde für das ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)⁶⁾ optimiert. In der Validierungsstudie wurde es in Kombination mit AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase⁶⁾ angewendet. Bei der Anwendung anderer Thermocycler kann eine spezielle Anpassung erforderlich sein. Die für die Enzymaktivierung erforderliche Temperatur und Zeit hängen von der konkreten verwendeten Polymerase ab. In Tabelle A.4 sind die Reaktionsbedingungen beschrieben.

Tabelle A.4 — Durchführung – Reaktionsbedingungen

		Zeit s	Temperatur °C
Dekontaminierung vor der PCR		120	50
Aktivierung der DNA-Polymerase und Denaturierung der Proben-DNA vor der PCR		600	95
PCR (50 Zyklen)			
Schritt 1	Auftrennen (Denaturierung)	15	95
Schritt 2	Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation)	60	60

A.1.8 Einschränkungen und Auswertung der Ergebnisse

Das Vorliegen von PCR-Inhibitoren kann einen großen Einfluss auf die Genauigkeit der geschätzten Kopiezahl von *adh1* in den analysierten Proben haben. Deshalb sollte das Fehlen von nachweisbaren PCR-Inhibitoren verifiziert werden (siehe auch ISO 21571:2005, Anhang A), z. B. durch Herstellen von Reihenverdünnungen der Matrizen-DNA und Untersuchung der Übereinstimmung zwischen den Verdünnungen und den Unterschieden zwischen den C_t -Werten (Schwellenwert-Zyklen) (d. h. ein C_t entspricht einer Verdopplung der Matrizenkonzentration).

Bei der Anwendung dieses Verfahrens in Kombination mit einem Verfahren zur quantitativen Bestimmung von GVO-DNA ist es wichtig, dass die absolute Menge an Matrizen-DNA (ng) für *adh1*-PCR und GVO-spezifische PCR gleich ist. Wenn nicht, kann die absolute Kopiezahl der Reaktionen nicht direkt verglichen werden und es ist eine Anpassung der entsprechenden Kopiezahlen erforderlich. Andernfalls kann keine relative GVO-Konzentration berechnet werden.

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

A.1.9 Kalibrierung und Berechnung der Ergebnisse

Kalibrierpunkte werden mit DNA erstellt, die eine definierte Menge an absoluten Kopiezahlen von haploider genomische Mais-DNA umfasst, in der die Zielsequenz enthalten ist.

Durch Auftragen der C_t -Werte gegen den Logarithmus der Kopiezahl der Zielsequenz für die Kalibrierpunkte wird eine Kalibrierkurve erstellt. Das kann z. B. durch Anwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms, z. B. Microsoft Excel⁶⁾, oder direkt durch Optionen erfolgen, die mit der Software des Sequenznachweissystems zur Verfügung stehen.

Die Kalibrierkurve wird angewendet, um die absoluten Kopiezahlen der haploiden genomische Mais-DNA der unbekannten Proben zu erhalten. Obwohl die Proben-DNA durch Lebensmittelverarbeitung abgebaut sein kann oder möglicherweise andere Bestandteile als Mais enthält, beeinflusst das nicht die berechnete Anzahl haploider Genomkopien von unbekannten Proben.

A.2 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von DNA, die aus Reis stammt

A.2.1 Kurzbeschreibung

Das *SPS*-Gen aus Reis wurde in [59] als geeignet für die Verwendung als endogenes Referenzgen zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von gv Reis beschrieben. Vom GMO Detection Laboratory der Shanghai Jiao Tong University (GMDL-SJTU) wurde ein Ringversuch zur Validierung der Eignung des *Sucrose-Phosphat-Synthase* (*SPS*)-Gens als endogenes Reisgen für die quantitative Analyse von gentechnisch verändertem (gv) oder nicht-gv Reis organisiert. Am Ringversuch nahmen zwölf Laboratorien aus Spanien, Korea, Litauen, Slowenien, Japan, Italien und China teil.

Die Verfahrensvorschrift für den Ringversuch umfasste die folgenden Module:

- quantitative Real-time-PCR zur quantitativen Bestimmung von Reis-DNA-Blindproben zur Erstellung von Kalibrierkurven;
- quantitative Real-time-PCR zur quantitativen Bestimmung von Reis-DNA-Blindproben unter Anwendung der erstellten Kalibrierkurven.

Der Ringversuch wurde nach den folgenden international anerkannten Leitlinien durchgeführt.

- ISO 5725 [51] bis [56];
- IUPAC-Protokoll „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies“ (Vorschrift zur Gestaltung, Durchführung und Auswertung von Studien zur Leistung von Untersuchungsverfahren) [12].

Die Ergebnisse des Ringversuchs (sowie die zugehörige Vorschrift) sind in A.2.3.3 angegeben.

A.2.2 Anwendungsbereich

Das Verfahren wurde für Reiskörner und verarbeitete Reisprodukte optimiert, die Mischungen aus Reis und anderen Matrices, wie z. B. Mais und Soja, enthalten. Die Eignung des *SPS*-Gens wurde in einem Ringversuch untersucht, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die aus Reiskörnern extrahiert wurden.

A.2.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.2.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit des quantitativen Real-time-PCR-Systems zum Nachweis des *SPS*-Gens wurde vom Methodenentwickler anhand von verschiedenen Temperatur-Zeit-Programmen (d. h. mit zwei Schritten und mit drei Schritten) an drei verschiedenen DNA-Proben mit bekannten Mengen an Reis-DNA (Proben mit 10 ng, 1 ng, 0,1 ng Reis-Genom-DNA) geprüft. Es erfolgten drei Wiederholungen je Probe. Das quantitative Real-time-PCR-System wies die erwartete Robustheit und bei den verschiedenen Temperatur-Zeit-Programmen und den drei Konzentrationen der Reis-DNA-Proben ein gutes Leistungsverhalten auf.

Das quantitative-PCR-System des *SPS*-Gens wurde auch an verschiedenen Real-time-PCR-Geräten (Rotor-Gene 3000A, Corbett Research und ABI 7700, Applied Biosystems⁷⁾ mit drei verschiedenen Reaktionsvolumina (20 µl, 25 µl und 30 µl und drei Wiederholungen je Volumen) geprüft. Das quantitative Real-time-PCR-System wies die erwartete Robustheit und bei den verschiedenen Real-time-PCR-Geräten und Reaktionsvolumina ein gutes Leistungsverhalten auf.

A.2.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Zur Probenvorbereitung wurden alle DNA-Proben nach dem Cetyl(trimethyl)ammoniumbromid (CTAB-)Verfahren nach ISO 21571 extrahiert. Die quantitative Bestimmung der Menge der insgesamt extrahierten DNA durch spektralphotometrische Messung erfolgte unter Anwendung des Verfahrens nach ISO 21571:2005, B.1. Nach der quantitativen Bestimmung der DNA wurde eine quantitative Real-time-PCR durchgeführt, um Angaben über eine mögliche PCR-Inhibition zu erhalten.

Das System für die PCR des *SPS*-Gens wurde unter Verwendung von genomischer Reis-DNA von drei Forschern geprüft und führte zu zufriedenstellenden Ergebnissen; insbesondere betrug die systematische Abweichung bei der quantitativen PCR im dynamischen Bereich (d. h. 0,05 ng bis 1,00 ng) weniger als 25 %.

A.2.3.3 Ringversuch

Die Kalibrierkurven wurden unter Verwendung von seriell verdünnten DNA-Proben, die vom GMDL-SJTU aus vier Reissorten extrahiert worden waren, durch quantitative PCR erstellt: Die Effizienz der PCR, berechnet aus dem Anstieg der Kalibrierkurve nach $[(10^{(-1/a)} - 1) \cdot 100]$, wobei a die Steigung ist, lag für das *SPS*-PCR-Nachweissystems im Bereich von 0,846 3 bis 1,223 3 und die Linearität (Regressionskoeffizient R_C^2) betrug durchschnittlich 0,997.

Die Ergebnisse der acht DNA-Blindproben sind in Tabelle A.5 angeführt. Diese werden in Bezug auf die Annahmekriterien und die Leistungsanforderungen des Verfahrens ausgewertet, wie vom Europäischen Netzwerk der GVO-Laboratorien ENGL festgelegt und vom Europäischen Referenzlabor für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel (EU-RL GMFF) übernommen [60]. In Tabelle A.5 sind die Schätzwerte sowohl für die Wiederholpräzision als auch für die Vergleichpräzision für jede Reiskonzentration nach der Identifizierung und Eliminierung von Ausreißern entsprechend dem Cochran-Test angegeben.

7) 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.

Tabelle A.5 — Ergebnisse der quantitativen Real-time-PCR

Parameter	Blindproben							
	0,5 ng	0,5 ng	1 ng	1 ng	2 ng	5 ng	5 ng	10 ng
Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	12	12	12	12	12	12	12	12
Proben je Laboratorium	1	1	1	1	1	1	1	1
Gesamtanzahl der Daten	108	108	108	108	108	108	108	108
ausgeschlossene Daten	4	2	0	8	0	0	0	0
Grund für den Ausschluss	Test nach Cochran	Test nach Cochran	–	Test nach Cochran	–	–	–	–
Mittelwert	0,407 8	0,412 1	0,814 6	0,734 4	1,857 5	5,261 0	5,445 7	10,889 6
Wiederhol-Standardabweichung	0,058 3	0,071 9	0,143 5	0,111	0,336 2	0,936 4	1,142 7	1,867 7
Variationskoeffizient der Wiederholpräzision, %	14,29	17,44	17,62	15,11	18,10	17,80	20,98	17,15
Vergleich-Standardabweichung	0,130 2	0,061 8	0,249 6	0,092 7	0,201 3	0,810 9	0,989 6	1,617 5
Variationskoeffizient der Wiederholpräzision, %	31,92	14,99	30,65	12,63	10,84	15,41	18,17	14,85
systematische Abweichung, absoluter Wert	0,092 2	0,087 8	0,185 3	0,265 5	0,142 4	–0,261 0	–0,445 8	–0,889 6
systematische Abweichung, %	–18,44	–17,57	–18,54	–26,53	–7,12	5,22	8,92	8,90

A.2.3.4 Molekulare Spezifität

A.2.3.4.1 Allgemeines

Die für das 81-bp-Fragment spezifischen Primer und Sonde sind in Tabelle A.6 aufgelistet.

Tabelle A.6 — Sequenzen der Oligonukleotid-Primer und -Sonde

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids (5' nach 3')
<i>Primer- und Sondensequenz für die quantitative Real-time-PCR</i>	
SPS-Primer F	TTg CgC CTg AAC ggA TAT
SPS-Primer R	Cgg TTg ATC TTT TCg ggA Tg
SPS-Sonde	HEX- TCC gAg CCg TCC gTg CgT C -TAMRA

A.2.3.4.2 Experimentell

Die aus den elf verschiedenen Pflanzenmaterialien (einschließlich Reis) extrahierten DNA-Proben wurden 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 (Bambus, Grüne Borstenhirse, Gerste, Weizen, Kolbenhirse, Raps, Tomate, Kartoffel, Sojabohne und Ackerschmalwand) führten zu negativen Ergebnissen.

Die aus zwölf verschiedenen Reissorten extrahierten DNA-Proben wurden mit dem PCR-System für den Nachweis des *SPS*-Gens analysiert. Alle zwölf Proben führten zu positiven Ergebnissen.

A.2.3.4.3 Theoretisch

Die theoretische Spezifität der Primer und der Sonde für das *SPS*-Gen wurde durch Suche nach Ähnlichkeiten unter Anwendung des Programms BLASTN 2.0MP-WashU [64] (Datum der Recherche: 9. Januar 2010) beurteilt. Die zur Abfrage verwendete 81-bp-Sequenz ist Teil der NCBI-Eintrag-Nummer U33175 (Nukleotide 1055 bis 1135). Die Ergebnisse der BLAST-Recherche bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit der *SPS*-Gen-Sequenz von Reis und die fehlende Ähnlichkeit mit anderen Genen und Spezies.

A.2.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Ein 81-bp-Fragment des *SPS*-Gens wird mit zwei Reis-*SPS*-spezifischen Primern amplifiziert. Die Anreicherung von Amplifikaten wird am Ende jedes PCR-Zyklus (Echtzeit) mit einer Reis-*SPS*-spezifischen Oligonucleotid-Sonde gemessen, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist: FAM als Reporter-Farbstoff und TAMRA als Quencher-Farbstoff (siehe Tabelle A.6). Hierzu wird die TaqMan-Chemie⁷⁾ eingesetzt. Das gemessene Fluoreszenzsignal überschreitet nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen einen vom Anwender festgelegten Schwellenwert. Diese Anzahl wird C_t -Wert genannt. Zur quantitativen Bestimmung des Gehaltes an Reis-*SPS*-DNA in einer unbekannten Probe wird der C_t -Wert durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve, deren C_t -Werte direkt mit bekannten Kopienzahlen verbunden sind (Regressionsanalyse), in einen entsprechenden Wert der Kopienzahl umgewandelt.

A.2.5 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die Begriffe nach ISO 5725-1 [51] und ISO 24276.

A.2.6 Probenart und -mengen

In diesem Ringversuch wurden DNA-Proben, die aus Reiskörnern von vier Reissorten extrahiert wurden, zur Erstellung der Kalibrierkurven verwendet. Anschließend wurden unter Anwendung der vier erstellten Kalibrierkurven acht Blindproben untersucht.

Die Teilnehmer erhielten die folgenden Proben:

- vier DNA-Proben von verschiedenen Reissorten (3M, Indica-Sorte aus den USA; Balilla, Japonica-Sorte aus Italien; Guangluai, Indica-Sorte aus Südchina und Shennong265, chinesische Japonica-Sorte), 50 ng/μl, jeweils 30 μl. Die DNA jeder Reissorte wurde verdünnt und zur Erstellung der entsprechenden Kalibrierkurve verwendet;
- acht Reis-DNA-Blindproben von vier verschiedenen Reissorten mit verschiedenen Konzentrationen (0 ng/μl bis etwa 50 ng/μl), jeweils 50 μl;
- negative DNA-Zielkontrolle (bezeichnet als N): DNA aus Lachssperma (20 ng/μl);
- positive DNA-Zielkontrolle (bezeichnet als P): Genom-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;
- Primer und Sonden für das PCR-System des *SPS*-Gens siehe Tabelle A.6 und weitere Reaktionsreagenzien wie folgt:
 - Mastermix für Real-time-PCR (1 ml × 6);
 - DNA-Verdünnungslösung (0,1fach konzentrierte TE-Pufferlösung, 1,2 ml).

A.2.7 Bestimmungsgrenze (LOQ), Anwendungsbereich

In Übereinstimmung mit dem entwickelten Verfahren beträgt die absolute LOQ des Verfahrens 0,01 ng/μl. Die relative LOQ der quantitativen PCR wurde im Ringversuch nicht bestimmt.

A.2.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Gesamt(mess)unsicherheit des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe Tabelle A.5).

A.2.9 Störanfälligkeiten

Die Menge und die Amplifizierbarkeit der als Matrize für die Real-time-PCR verwendeten Nukleinsäure sind von entscheidender Bedeutung für die Sensitivität des Verfahrens. Neben diesem allgemeinen Punkt sind für dieses Verfahren keine besonderen Störanfälligkeiten bekannt.

A.2.10 Physikalische- und Umgebungsbedingungen

- Das Verfahren erfordert Erfahrung hinsichtlich der Arbeit unter sterilen Bedingungen;
- die Aufrechterhaltung streng getrennter Arbeitsbereiche für DNA-Extraktion, PCR-Ansatz und PCR-Amplifikation;
- vor dem Gebrauch sollten sämtliche DNA-Rückstände von der Ausrüstung entfernt werden;
- zur Vermeidung von Kontamination sollten Aerosol-geschützte Filterpipettenspitzen (A.2.11.6) verwendet werden;
- es dürfen nur puderfreie Handschuhe (A.2.11.8) verwendet werden und diese müssen oft gewechselt werden;
- Labortische und Ausrüstung sind regelmäßig mit Natriumhypochlorit-Lösung (10 % aktives Chlor) zu reinigen (Bleichmittel);
- Pipetten sollten bei Bedarf regelmäßig kalibriert werden.

A.2.11 Geräte und Ausrüstung

Übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgendes:

A.2.11.1 Mikrozentrifuge

A.2.11.2 Gefrierschrank bei –20 °C und Kühlschrank bei 4 °C

A.2.11.3 Mikropipetten

A.2.11.4 Vortex-Mischer

A.2.11.5 Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 1,5 ml und 2,0 ml

A.2.11.6 Spitzen und Filterspitzen für Mikropipetten

A.2.11.7 Gestell für Reaktionsgefäße

A.2.11.8 Vinyl- oder Latexhandschuhe

A.2.11.9 Vakuumtrockner geeignet zum Trocknen der DNA-Pellets, optional

A.2.11.10 Real-time-PCR-System mit Reaktionsräumen aus Kunststoff, geeignet für Fluoreszenzdetektion

A.2.11.11 Software: Sequence Detection System⁷⁾, Version 1.7 (Applied Biosystems, Teilenummer 4311876) oder gleichwertige Versionen

A.2.11.12 optische Reaktionsplatten mit 96 Vertiefungen, MicroAmp®⁷⁾ (Applied Biosystems, Teilenummer N801-0560⁷⁾)

A.2.11.13 optische Abdeckfolien, MicroAmp®⁷⁾ (Applied Biosystems, Teilenummer 4311971⁷⁾)

A.2.11.14 optische Deckel, MicroAmp®⁷⁾ (Applied Biosystems, Teilenummer 801-0935⁷⁾)

A.2.12 Chemikalien und Hilfsstoffe

A.2.12.1 Allgemeines

Wenn nicht anders angegeben, werden nur Reagenzien nach ISO 24276 verwendet und nur steriles destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser von vergleichbarer Reinheit.

A.2.12.2 DNA-Extraktion

A.2.12.2.1 Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), hochrein

A.2.12.2.2 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid (tris), für die Molekularbiologie geeignete Qualität

A.2.12.2.3 Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA), mittels Titration bestimmte Reinheit von 99,9 %;

A.2.12.2.4 Ethanol, $\varphi(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})$ mindestens 96 % Volumenanteil

A.2.12.2.5 Isopropanol, $\varphi[\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3]$ mindestens 99,7 % Volumenanteil

A.2.12.2.6 Chloroform, $\varphi(\text{CHCl}_3)$ mindestens 99 % Volumenanteil

A.2.12.2.7 Natriumchlorid, $w(\text{NaCl})$ mindestens 99 % Massenanteil

A.2.12.2.8 Natriumhydroxid, wasserfrei, $w(\text{NaOH})$ mindestens 98 % Massenanteil

A.2.12.2.9 RNase A-Lösung, 10 mg/ml

A.2.12.2.10 Proteinase K-Lösung, 20 mg/ml

A.2.12.2.11 Verdünnungspufferlösung tris (A.2.12.2.2), 10 mmol/l, pH 9,0

A.2.12.2.12 Salzsäure, $\rho(\text{HCl}) = 370 \text{ g/l}$

A.2.12.2.13 DNA aus Heringssperma, DNA aus Kalbsthymus oder DNA des Lambda-Bakteriophagen

A.2.12.3 Quantitative Real-time-PCR

TaqMan®⁷⁾ Universal PCR-Mastermix (einfach konzentriert) oder entsprechende Alternative.

A.2.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen dürfen bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung (A.2.11.2) sind –20 °C erforderlich. Bei einem quantitativen Real-time-PCR-Ansatz müssen die PCR-Reagenzien im aufgetauten Zustand bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt werden.

A.2.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Es muss sichergestellt werden, dass die Untersuchungsprobe für die Laboratoriumsprobe repräsentativ ist, z. B. durch Zerkleinern oder Homogenisieren. Die zu berücksichtigenden Maßnahmen und Arbeitsschritte sind im Detail in ISO 21571 beschrieben. Für den Ringversuch wurde eine Gesamtmenge von 1 g gemahlene Reismudeln verwendet.

A.2.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte, z. B. Thermocycler und Pipetten, müssen z. B. nach ISO/IEC 17025 [61] kalibriert werden.

A.2.16 Analysenschritte

A.2.16.1 Allgemeines

A.2.16.1.1 Aufbereitung der DNA für die Erstellung von Kalibrierkurven

Jede der Reis-DNA-Proben mit 50 ng/µl wurde mit DNA-Verdünnungslösung, die vom Verfahrensentwickler bereitgestellt wurde, auf 10 ng/µl, 1 ng/µl, 0,1 ng/µl, 0,01 ng/µl, 0,002 ng/µl verdünnt und 5 µl von jeder der verdünnten DNA-Proben wurde für die Real-time-PCR zur Erstellung der Kalibrierkurven verwendet.

Hinsichtlich spezifischer Anforderungen siehe ISO 21571.

A.2.16.1.2 PCR-Reagenzien

A.2.16.1.2.1 TaqMan® Universal PCR-Mastermix

Siehe A.2.12.3.

A.2.16.1.2.2 Primer und Sonden

Siehe Tabelle A.6.

A.2.16.2 Durchführung

A.2.16.2.1 Allgemeines

Die quantitative PCR für das *SPS*-Gen von Reis wurde für ein Gesamtvolumen von 25 µl je Reaktionsgemisch entwickelt.

Der für den Versuch benötigte Mastermix für die quantitative Real-time-PCR und die für den Versuch benötigten DNA-Proben werden aufgetaut, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Die aufgetauten Reagenzien werden bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt.

20 µl/Röhrchen des Mastermixes werden in 200-µl-PCR-Reaktionsröhrchen (A.2.11.5) verteilt. Jeweils 5 µl der DNA-Probenlösung, der bezüglich Reis positiven Kontrolle, der negativen Kontrolle und der Leerwertkontrolle (H₂O) werden in die Reaktionsröhrchen gegeben.

Der Inhalt der PCR-Röhrchen wird vorsichtig gemischt, die Röhrchen werden in der Mikrozentrifuge (A.2.11.1) 10 s bei 1 000 g zentrifugiert.

Die Platte (A.2.11.12) wird ins Gerät gestellt.

Die PCR wird unter den Bedingungen für die Zyklen der quantitativen Real-time-PCR durchgeführt.

A.2.16.2.2 PCR-Kontrollen

Siehe A.2.6.

A.2.16.2.3 Vorbereitung der Standards

Durch Auftragen der C_t -Werte gegen den Logarithmus der DNA-Menge (in Nanogramm) werden die Kalibrierkurven erstellt. Dies kann durch Anwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms (z. B. Microsoft Excel⁷⁾) oder direkt durch Optionen erfolgen, die mit der Software (A.2.11.11) des Sequenznachweissystems zur Verfügung stehen.

Die Masse an DNA in der unbekannten Probe in Nanogramm wird durch Interpolation aus den Kalibrierkurven erhalten.

A.2.16.2.4 Temperatur-Zeit-Programm (PCR)

Der PCR-Assay wurde für die Anwendung in einem ABI Prism⁷⁾ 7700 Sequence Detection System und einem Rotor-Gene 3000A⁷⁾ Real-time-PCR-System optimiert (A.2.11.10). Auch andere Systeme dürfen verwendet werden. In diesem Fall müssen die Einstellwerte des Thermocyclers möglicherweise angepasst werden. Das Temperatur-Zeit-Programm für die quantitative Real-time-PCR ist in Tabelle A.7 wiedergegeben.

Tabelle A.7 — Temperatur-Zeit-Programm für die quantitative Real-time-PCR

Schritt	Stufe		Temperatur °C	Zeit s	Erfassung	Zyklen
1	Aktivierung der DNA-Polymerase und Denaturierung		95	900	Nein	1×
2	Amplifikation	Auftrennen (Denaturierung)	95	15	Nein	40×
3		Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Extension)	60	45	Messung	

A.2.16.2.5 Annahme- oder Zurückweisungskriterien

A.2.16.2.5.1 Die Annahme- und Leistungskriterien sind in [60] beschrieben.

Die bei der Auswertung der Ergebnisse aus dem Ringversuch angewendeten Anforderungen an die Verfahrensleistung bei der quantitativen PCR sind in A.2.16.2.5.2 bis A.2.16.2.5.4 angegeben.

A.2.16.2.5.2 Der dynamische Bereich des Verfahrens sollte 1/10 und mindestens das Fünffache der Zielkonzentration einschließen. Die Zielkonzentration sollte als Schwellenwert in Bezug auf gesetzliche Anforderungen dienen.

A.2.16.2.5.3 Der Variationskoeffizient der Vergleichspräzision sollte über den gesamten dynamischen Bereich weniger als 35 % der Zielkonzentration betragen. Bei Konzentrationen von weniger als 0,2 % ist ein $C_{V,R}$ von < 50 % annehmbar.

A.2.16.2.5.4 Die Richtigkeit sollte über den gesamten dynamischen Bereich ± 25 % des angenommenen Referenzwertes betragen.

A.2.16.2.6 Identifizierung

Die Verwendung einer TaqMan⁷⁾-Sonde ermöglicht eine eindeutige Identifizierung des Amplifikats.

A.2.17 Identifizierung der Proben

Siehe A.2.6.

A.2.18 Auswertung und Berechnung

Nach dem Abschluss der quantitativen Real-time-PCR wird die Linie für den Schwellenwert in dem Bereich angeordnet, in dem die Amplifikationsprofile parallel verlaufen (exponentielle Phase der PCR — logarithmischer Modus) und wo kein Kreuzeffekt zwischen den Wiederholungen der gleichen Probe vorliegt. Die Anzahl der Zyklen, bei der die Schwellenwert-Linie die erste Amplifikationskurve schneidet, wird bestimmt und die Grundlinie wird drei Zyklen vor diesem Wert angeordnet. All diese Daten werden für weitere Berechnungen exportiert.

Nachdem in der logarithmischen Phase der Amplifikation wie im vorstehenden Absatz beschrieben ein Schwellenwert-Zyklus festgelegt wurde, berechnet die Gerätesoftware die C_t -Werte für jede Reaktion. Die Kalibrierkurven werden entsprechend den C_t -Werten beim Schwellenwert und dem dezimalen Logarithmus der ursprünglichen Mengen der Matrizen-DNA erstellt.

Anschließend wird der DNA-Gehalt in der Blindprobe durch Interpolation aus den Kalibrierkurven ermittelt.

A.2.19 Führen von Aufzeichnungen

Das Führen von Aufzeichnungen muss den Anforderungen von ISO/IEC 17025 [61] entsprechen.

A.2.20 Berichterstattung

Die Berichterstattung muss den Anforderungen von ISO 24276 und ISO/IEC 17025 [61] entsprechen.

A.2.21 Sicherheitsvorkehrungen

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276.

A.2.22 Umweltschutzmaßnahmen und Abfallbeseitigung

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276.

A.3 Für die taxonomische Zielgruppe spezifisches Verfahren zum Nachweis von Bestandteilen aus Tomaten (*Lycopersicon esculentum*)

A.3.1 Kurzbeschreibung

Das LAT52-Gen kodiert ein hitzestabiles, glycosyliertes, Cystein-reiches Protein, das für die Entwicklung (Reifung) der Tomatenpollen notwendig ist. Es wurde bewiesen, dass das System als endogenes Referenzgen bei der Identifizierung und quantitativen Bestimmung von gv Tomaten zum Nachweis von LAT52 geeignet ist [62]. Vom GMO Detection Laboratory der Shanghai Jiao Tong University (GMDL-SJTU) wurde ein Ringversuch zur Validierung des Verfahrens zum Nachweis des Tomatengens LAT52 als endogenes Tomatengen zur quantitativen Analyse gentechnisch veränderter (gv) oder nicht-gv Tomaten organisiert. Am Ringversuch nahmen dreizehn Laboratorien aus den USA, Singapur, Korea, Litauen, Slowenien, Norwegen, Italien und China teil. Die Ergebnisse sind Anhang 1 und 2 von [63] veröffentlicht.

Die Verfahrensvorschrift für den Ringversuch umfasste die folgenden Module:

- quantitative Real-time-PCR zur Erstellung quantitativer Kalibrierkurven unter Verwendung von Tomaten-DNA-Proben von vier verschiedenen Tomatensorten;
- quantitative Real-time-PCR zur quantitativen Bestimmung von Tomaten-DNA-Blindproben unter Anwendung der erstellten Kalibrierkurven.

Der Ringversuch wurde nach den folgenden international anerkannten Leitlinien durchgeführt:

- ISO 5725 [51] bis [56] wird besonders in Bezug auf das Maß für die Präzision (d. h. Wiederhol- und Vergleichspräzision) und Richtigkeit berücksichtigt;
- IUPAC-Protokoll „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies“ (Vorschrift zur Gestaltung, Durchführung und Auswertung von Studien zur Leistung von Untersuchungsverfahren) [12].

A.3.2 Anwendungsbereich

Das vorliegende Verfahren legt den Nachweis von Tomaten-DNA mit quantitativer PCR fest.

Das Verfahren wurde für Tomatensamen, Tomaten (Früchte), Tomatenketchup und Tomatensaft optimiert, wobei Mischungen aus Tomate und anderen Matrices, wie z. B. Mais und Soja, enthalten sind. Die Anwendbarkeit des *LAT52*-Gens wurde in einem Ringversuch untersucht, wobei DNA-Proben verwendet wurden, die aus Tomatensaatgut extrahiert wurden.

A.3.3 Validierungsstatus und Leistungskriterien

A.3.3.1 Robustheit des Verfahrens

Die Robustheit des Systems für die quantitative Real-time-PCR von *LAT52* wurde vom Verfahrensentwickler bei drei verschiedenen Temperatur-Zeit-Programmen (d. h. mit zwei Schritten und mit drei Schritten; bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen, d. h. 58 °C, 59 °C und 60 °C) an drei verschiedenen DNA-Proben mit bekannten Mengen an DNA aus Tomaten (Proben mit 10 ng, 1 ng, 0,1 ng Tomaten-Genom-DNA und drei Wiederholungen je Probe) geprüft. Die Systeme für die quantitative Real-time-PCR wiesen die erwartete Robustheit bei den Temperatur-Zeit-Programmen und drei Konzentrationen der Tomaten-DNA-Proben auf.

Das System für die quantitative PCR des *LAT52*-Gens wurde auch an verschiedenen Thermocyclern für Real-time-PCR (Rotor-Gene 3000A⁷, Corbett Research und ABI 7700⁷) mit drei verschiedenen Reaktionsvolumina (20 µl, 25 µl und 30 µl und drei Wiederholungen je Volumen) geprüft. Das System für die quantitative Real-time-PCR wies bei den verschiedenen Thermocyclern für Real-time-PCR und den verschiedenen Reaktionsvolumina die erwartete geeignete Robustheit auf.

A.3.3.2 Versuch innerhalb eines Laboratoriums

Das *LAT52*-Gen aus Tomaten wurde für die Verwendung als endogenes Referenzgen zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von gv Tomaten validiert [62]. Das PCR-System zur Untersuchung von *LAT52* wurde auch von drei Bearbeitern am GMDL-SJTU unter Verwendung von Tomaten-Genom-DNA geprüft, was zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte; insbesondere betrug die systematische Abweichung bei der quantitativen PCR im dynamischen Bereich (d. h. 0,05 ng bis 1,00 ng) weniger als 25 %.

A.3.3.3 Ringversuch

Die Ergebnisse des Ringversuchs sind in [63] wiedergegeben. Kurz zusammengefasst wurden im Ringversuch zur Probenvorbereitung alle DNA-Proben vom GMDL-SJTU nach dem CTAB-Verfahren nach ISO 21571:2005, A.3, extrahiert. Die quantitative Bestimmung der Menge der insgesamt extrahierten DNA durch spektralphotometrische Messung erfolgte unter Anwendung eines Verfahrens nach ISO 21571:2005, B.1. Nach der quantitativen Bestimmung der DNA wurde eine quantitative Real-time-PCR durchgeführt, um Angaben über eine mögliche PCR-Inhibition zu erhalten. Anschließend wurden die vorbereiteten DNA-Proben an alle teilnehmenden Laboratorien versendet.

Die Kalibrierkurven wurden unter Verwendung der verdünnten DNA-Proben aus Tomatensamen von vier Sorten unter Anwendung quantitativer PCR erstellt: Die Effizienz der PCR für das *LAT52*-Gen, berechnet aus dem Anstieg der Kalibrierkuve nach $[(10^{(-1/a)} - 1) \cdot 100]$, wobei a die Steigung ist, lag im Durchschnitt bei 96,6 % und die Linearität (Regressionskoeffizient R_c^2) betrug durchschnittlich 0,997.

Die Ringversuchsergebnisse der acht DNA-Blindproben sind in Tabelle A.8 zusammengefasst. Zur Auswertung dieser Daten wurden die Anforderungen an die Leistung des Verfahrens, wie vom Europäischen Netzwerk der GVO-Laboratorien (ENGL) festgelegt und vom Europäischen Referenzlabor für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel (EU-RL GMFF) [60], angewendet. Nach der Eliminierung der Ausreißer auf der Grundlage eines 95 %-Vertrauensbereichs nach ISO 5725-2 [52] werden die abgeleitete Wiederholpräzision und Vergleichpräzision für jede Tomatenkonzentration in Tabelle A.8 angegeben.

Tabelle A.8 — Validierungsdaten des Systems für die Real-time-PCR von LAT52

Parameter	Unbekannte Probe							
	0,5 ng				0,05 ng			
	Zhongsu5	R144	Zaofeng	Lichun	Zhongsu5	R144	Zaofeng	Lichun
Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	13	13	13	13	13	13	13	13
Proben je Laboratorium	4	4	4	4	4	4	4	4
ausgeschlossene Daten	2	5	4	4	5	8	7	10
Grund für den Ausschluss	Daten liegen nicht im Vertrauensbereich von 95 %							
Mittelwert	0,446 8	0,480 6	0,487 5	0,488 6	0,045 9	0,049 0	0,049 8	0,045 7
Wiederholstandardabweichung	0,120	0,122	0,109	0,133	0,015	0,015	0,014	0,011
Variationskoeffizient der Wiederholpräzision, %	26,76	25,41	22,46	27,12	32,06	30,41	29,00	24,73
Vergleichstandardabweichung	0,084	0,077	0,073	0,091	0,007	0,009	0,007	0,004
Variationskoeffizient der Vergleichpräzision, %	18,751	15,99	15,04	18,68	15,00	18,61	14,21	8,65
systematische Abweichung, absoluter Wert	0,053	0,019	0,012	0,011	0,004	0,001	0,000	0,004
systematische Abweichung, %	10,64	3,88	2,50	2,29	8,26	1,92	0,43	8,68

A.3.3.4 Molekulare Spezifität

A.3.3.4.1 Allgemeines

Das Verfahren ist auf das LAT52-Gen ausgerichtet, von dem im haploiden Genom verschiedener Tomatensorten stabil eine Einzelkopie vorliegt. Die auf das 92-bp-Fragment der LAT52-DNA ausgerichteten Primer und die zugehörige Sonde sind in Tabelle A.9 wiedergegeben.

Tabelle A.9 — Sequenzen der Oligonukleotid-Primer und -Sonde

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids (5' nach 3')
<i>Primer- und Sondensequenz für die quantitative Real-time-PCR</i>	
LAT52-Primer F	AgA CCA CgA gAA CgA TAT TTg C
LAT52-Primer R	TTC TTg CCT TTT CAT ATC CAg ACA
LAT52-Sonde	HEX- CTC TTT gCA gTC CTC CCT Tgg gCT-BHQ

A.3.3.4.2 Experimentell

Die aus den elf verschiedenen Pflanzenmaterialien (einschließlich Tomate) extrahierten DNA-Proben wurden mit dem PCR-System für den Nachweis des LAT52-Gens analysiert [62]. Von den elf Proben führte nur die Tomaten-DNA zu einem positiven Ergebnis. Die anderen zehn Proben, wie z. B. Aubergine, Kartoffel, Petunie, Paprika, Mais, Sojabohne, Rübsen, Reis, Tabak und Ackerschmalwand, führten zu negativen Ergebnissen.

Die aus zwölf verschiedenen Tomatensorten unterschiedlicher geographischer und phylogenetischer Herkunft, z. B. Shengnong2, Jifan4, Zhongsu5, Yashu6, Jiafen1, Shenfeng2, Hongza9, R144, Nongyou30, Dongnong70, Lichun und Zaokui, extrahierten DNA-Proben wurden mit dem PCR-System für den Nachweis des LAT52-Gens analysiert. Alle zwölf Proben führten zu positiven Ergebnissen.

A.3.3.4.3 Theoretisch

Die theoretische Spezifität der *LAT52*-Primer und der zugehörigen Sonde wurde durch Suche nach Ähnlichkeiten unter Anwendung des Programms BLASTN 2.0MP-WashU [64] (Datum der Recherche: 20. Januar 2010) untersucht. Die zur Abfrage verwendete 92-bp-Sequenz von *LAT52* ist Teil der NCBI-Eintrag-Nummer X15855 (Nukleotide 1385 bis 1476); die Ergebnisse der BLAST-Recherche bestätigten die vollständige Identität der Suchsequenz mit für Staubbeutel von Tomaten spezifischen *LAT52*-Gen-Sequenzen.

A.3.4 Kurzbeschreibung und Zusammenfassung

Diese Methode ist ein quantitatives Real-time-TaqMan⁷⁾-PCR-Verfahren zum quantitativen Nachweis der *LAT52*-Zielsequenz aus Tomaten. Die Amplifikate werden während jedes Zyklus durch das Fluoreszenzsignal mit einer *LAT52*-spezifischen Oligonukleotid-Sonde quantitativ bestimmt, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist: HEX als Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und TAMRA als Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Der C_t -Wert wird zur Berechnung des Gehalts an Tomaten-DNA verwendet und der C_t -Wert ist der Schwellenwert-Zyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen einen Schwellenwert überschreitet.

Zur quantitativen Bestimmung der Anzahl von Kopien des *LAT52*-Gens aus Tomaten in einer unbekannten Probe wird der C_t -Wert dieser Probe bestimmt. Unter Verwendung von vier Kalibrierstandards wird eine Kalibrierkurve erstellt und die jeweiligen Kopienzahlen der unbekannten DNA-Proben berechnet.

A.3.5 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die Begriffe nach ISO 5725-1 [51] und ISO 24276.

A.3.6 Probenart und -mengen

Vier DNA-Proben aus verschiedenen Tomatensorten, wie z. B. R144, Zhongsu5, Zaofeng und Lichun, 50 ng/μl, jeweils 30 μl, wurden zur Erstellung der Kalibrierkurven verdünnt.

Acht unbekannte Tomaten-DNA-Proben aus 4 verschiedenen Tomatensorten mit verschiedenen Konzentrationen (0 ng/μl bis 50 ng/μl) und unterschiedlichen GM-Konzentrationen, jeweils 50 μl, wurden verwendet.

A.3.7 Nachweisgrenze (LOD), Bestimmungsgrenze (LOQ), Anwendungsbereich

Die absolute LOQ des quantitativen PCR-Verfahrens beträgt 0,01 ng je Reaktion, das entspricht etwa 11 Kopien der haploiden Tomaten-Genom-DNA. Die LOD des quantitativen PCR-Verfahrens wurde im Ringversuch nicht bestimmt.

A.3.8 Abschätzung der Messunsicherheit

Die Gesamt(mess)unsicherheit des Verfahrens ergibt sich aus den Ergebnissen des Ringversuchs (siehe A.3.3.3).

A.3.9 Störanfälligkeiten

Die vorbereiteten DNA-Proben sollten vor der PCR-Analyse auf PCR-Inhibitoren untersucht werden, um falsch negative Ergebnis zu vermeiden.

A.3.10 Physikalische- und Umgebungsbedingungen

Die Verfahren sollten unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt werden.

Es sind streng getrennte Arbeitsbereiche für DNA-Extraktion, PCR-Vorbereitung und PCR-Amplifikation aufrechtzuerhalten.

Vor dem Gebrauch sollten sämtliche DNA-Rückstände von der Ausrüstung entfernt werden.

Zur Vermeidung von Kontamination sollten Aerosol-geschützte Filterpipettenspitzen (A.3.11.6) verwendet werden.

Es sollten nur puderfreie Handschuhe (A.3.11.8) verwendet werden und diese sollten oft gewechselt werden.

Labortische und Ausrüstung sollten regelmäßig mit Natriumhypochlorit-Lösung (10 % aktives Chlor) gereinigt werden (Bleichmittel).

Pipetten sollten häufig auf Präzision überprüft und kalibriert werden.

A.3.11 Geräte und Ausrüstungen

Übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgendes:

A.3.11.1 Mikrozentrifuge

A.3.11.2 Gefrierschrank bei -20 °C und Kühlschrank bei 4 °C

A.3.11.3 Mikropipetten

A.3.11.4 Vortex-Mischer

A.3.11.5 Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 1,5 ml und 2,0 ml

A.3.11.6 Spitzen und Filterspitzen für Mikropipetten

A.3.11.7 Gestell für Reaktionsgefäße

A.3.11.8 Vinyl- oder Latexhandschuhe

A.3.11.9 Vakuumtrockner geeignet zum Trocknen der DNA-Pellets, wahlfrei

A.3.11.10 Gerät für Real-time-PCR

A.3.11.11 Reaktionsröhrchen oder Platten mit Vertiefungen für die Real-time-PCR sowie optische Deckel oder optische Abdeckfolien

A.3.11.12 Software: Sequence Detection System⁷⁾, Version 1.7 (Applied Biosystems, Teilenummer 4311876) oder gleichwertige Versionen

A.3.12 Reagenzien/Hilfsstoffe

Wenn nicht anders angegeben, werden nur Reagenzien nach ISO 24276 verwendet und nur steriles destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser von vergleichbarer Reinheit.

A.3.12.1 Real-time-PCR-Mastermix

A.3.12.2 Oligonukleotide (Primer und Sonde)

A.3.13 Entnahme, Transport, Konservierung und Lagerung von Proben

DNA-Lösungen sollten bei 4 °C höchstens eine Woche aufbewahrt werden, für eine Langzeitlagerung sind –20 °C (A.3.11.2) erforderlich. Bei einem quantitativen Real-time-PCR-Ansatz müssen die PCR-Reagenzien im aufgetauten Zustand bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt werden.

A.3.14 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe sollte für die Laboratoriumsprobe repräsentativ sein, z. B. durch Zerkleinern oder Homogenisieren der Proben. Die zu berücksichtigenden Maßnahmen und Arbeitsschritte sind in ISO 21571 ausführlich beschrieben.

A.3.15 Kalibrierung von Geräten

Die Geräte, z. B. Thermocycler und Pipetten, müssen z. B. nach ISO/IEC 17025 [61] kalibriert werden.

A.3.16 Analysenschritte

A.3.16.1 Allgemeines

A.3.16.1.1 Aufbereitung der DNA für die Erstellung von Kalibrierkurven

Die DNA wurde wie in A.3.3.3 beschrieben extrahiert, quantitativ bestimmt und an alle teilnehmenden Laboratorien versendet.

Jede der Tomaten-DNA-Proben mit 50 ng/μl wurde mit der 0,1fach konzentrierten TE-Pufferlösung auf 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl, 0,002 ng/μl verdünnt.

A.3.16.1.2 PCR-Reagenzien

A.3.16.1.2.1 Real-time-PCR-Mastermix

Siehe A.3.12.

A.3.16.1.2.2 Primer

Siehe Tabelle A.9.

A.3.16.2 Durchführung

A.3.16.2.1 Allgemeines

Der PCR-Ansatz für die auf das Tomatengen *LAT52* ausgerichtete quantitative PCR wurde für ein Gesamtvolumen von 25 μl je Reaktionsgemisch entwickelt.

Der für den Versuch benötigte Mastermix für die quantitative Real-time-PCR und die für den Versuch benötigten DNA-Proben werden aufgetaut, vorsichtig gemischt und zentrifugiert. Die aufgetauten Reagenzien werden bei 1 °C bis 4 °C auf Eis aufbewahrt.

20 μl des Mastermixes werden in 200-μl-PCR-Reaktionsröhrchen (A.3.11.5) verteilt. Jeweils 5 μl der DNA-Probenlösung, der bezüglich Tomate positiven Kontrolle, der negativen Kontrolle und der Leerwertkontrolle (H₂O) werden in die Reaktionsröhrchen (A.3.11.5) gegeben.

Die Lösung in den PCR-Röhrchen wird vorsichtig gemischt und kurz in einer Mikrozentrifuge (A.3.11.1) zentrifugiert.

Die Platte wird ins Gerät gestellt.

Die PCR wird unter den in A.3.16.2.4 beschriebenen Bedingungen für die Zyklen der quantitativen Real-time-PCR durchgeführt.

A.3.16.2.2 PCR-Kontrollen

Positive und negative Zielkontrollen sollten nach ISO 24276 erfolgen.

A.3.16.2.3 Vorbereitung der Standards

Durch Auftragen der C_t -Werte gegen den Logarithmus der Menge der Ziel-DNA in Nanogramm werden die Kalibrierkurven erstellt. Dies kann durch Anwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms (z. B. Microsoft Excel⁷⁾) oder direkt durch Optionen erfolgen, die mit der Software (A.3.11.12) des Sequenznachweissystems zur Verfügung stehen.

Die Masse an DNA in der unbekannten Probe in Nanogramm wird durch Interpolation aus den Kalibrierkurven erhalten.

A.3.16.2.4 Temperatur-Zeit-Programm (PCR)

Der PCR-Assay wurde für die Anwendung in einem ABI Prism⁷⁾ 7700 Sequence Detection System und einem Rotor-Gene 3000A⁷⁾ Real-time-PCR-System (A.3.11.10) optimiert. Auch andere Systeme dürfen verwendet werden, in diesem Fall müssen die Einstellwerte des Thermocyclers jedoch möglicherweise angepasst werden. Das Temperatur-Zeit-Programm für die quantitative Real-time-PCR ist in Tabelle A.10 angegeben.

Tabelle A.10 — Temperatur-Zeit-Programm für die quantitative Real-time-PCR

Schritt	Stufe		Temperatur °C	Zeit s	Erfassung	Zyklen
1	Aktivierung der DNA-Polymerase und Denaturierung		95	900	Nein	1×
2	Amplifikation	Denaturierung	95	15	Nein	40×
3		Anlagerung und Verlängerung	60	45	Messung	

A.3.16.2.5 Annahme- oder Zurückweisungskriterien

A.3.16.2.5.1 Die bei der Auswertung der Ergebnisse aus dem Ringversuch angewendeten Anforderungen an die Verfahrensleistung bei der quantitativen PCR sind in A.3.16.2.5.2 bis A.3.16.2.5.4 angegeben:

A.2.16.2.5.2 Der dynamische Bereich des Verfahrens sollte 1/10 und mindestens das Fünffache der Zielkonzentration einschließen. Die Zielkonzentration sollte als Schwellenwert in Bezug auf gesetzliche Anforderungen dienen.

A.2.16.2.5.3 Der Variationskoeffizient der Vergleichpräzision sollte über den gesamten dynamischen Bereich weniger als 35 % der Zielkonzentration betragen. Bei Konzentrationen von weniger als 0,2 % ist ein $C_{V,R}$ von < 50 % annehmbar.

A.2.16.2.5.4 Die Richtigkeit sollte über den gesamten dynamischen Bereich ± 25 % des angenommenen Referenzwertes betragen.

A.3.16.2.6 Identifizierung

Die Verwendung einer TaqMan^{®7)}-Sonde ermöglicht eine eindeutige Identifizierung des Amplifikats.

A.3.17 Identifizierung der Proben

Siehe A.3.6.

A.3.18 Auswertung und Berechnung

Nach dem Abschluss der quantitativen Real-time PCR wird die Schwellenwert-Linie in dem Bereich angeordnet, in dem die Amplifikationsprofile parallel verlaufen (exponentielle Phase der PCR — logarithmischer Modus) und wo kein Kreuzeffekt zwischen den Wiederholungen der gleichen Probe vorliegt. Die Anzahl der Zyklen, bei der die Schwellenwert-Linie die erste Amplifikationskurve schneidet, wird bestimmt und die Grundlinie wird drei Zyklen vor diesem Wert angeordnet. All diese Daten werden für weitere Berechnungen exportiert.

Nachdem in der logarithmischen Phase der Amplifikation wie im vorstehenden Absatz beschrieben ein Schwellenwert-Zyklus festgelegt wurde, berechnet die Gerätesoftware die C_t -Werte für jede Reaktion. Die Kalibrierkurven werden entsprechend den C_t -Werten beim Schwellenwert und dem dezimalen Logarithmus der ursprünglichen Mengen der Matrizen-DNA erstellt.

Anschließend werden die DNA Gehalte in der Blindprobe durch Interpolation aus den Kalibrierkurven ermittelt.

A.3.19 Führen von Aufzeichnungen

Das Führen von Aufzeichnungen muss den Anforderungen von ISO/IEC 17025 [61] entsprechen.

A.3.20 Berichterstattung

Die Berichterstattung muss den Anforderungen von ISO 24276 und ISO/IEC 17025 [61] entsprechen.

A.3.21 Sicherheitsvorkehrungen

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276.

A.3.22 Umweltschutzmaßnahmen/Abfallbeseitigung

Keine besonderen Anforderungen. Siehe ISO 24276.



Anhang B (informativ)

Screening-Verfahren

B.1 Screening-Verfahren zur relativen quantitativen Bestimmung der 35S-Promotor-DNA der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 mit Real-Time PCR

B.1.1 Einleitung

Dieser Anhang beschreibt ein Verfahren zur spezifischen Amplifikation und zum Nachweis eines taxon-spezifischen Gens aus Sojabohnen (Lectin-Gen, *le1*) und der 35S-Promotor-DNA, die aus dem Blumenkohl-mosaik-Virus stammt, sowie zur quantitativen Bestimmung der Menge an 35S-Promotor-DNA in Zutaten aus Sojabohnen, die die gentechnisch veränderte Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 (Roundup Ready®) enthalten.

Hinsichtlich der Einschränkungen siehe B.1.8.

B.1.2 Validierungsstatus und Leistungsmerkmale

B.1.2.1 Allgemeines

Das Verfahren wurde für zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM IRMM-410)⁸⁾ [18], bestehend aus getrocknetem Sojamehl (Sojapulver), das Mischungen aus GTS 40-3-2 und konventionellen Sojabohnen enthält, optimiert.

Die Vergleichpräzision der beschriebenen Verfahren wurde in Ringversuchen mit unbekannten Proben (Probengekennzeichnet mit SA bis SE, siehe Tabelle B.1) geprüft, die sich aus Mischungen von Referenzmaterialien der oben erwähnten Art zusammensetzen [19]. Zusätzlich wurden handelsübliche Lebensmittel geprüft [20].

Die Anzahl der Kopien jeder der Zielsequenzen je Genom wurde nicht im Einzelnen abgeschätzt [21], [22].

Das Verfahren wurde im Schweizerischen Lebensmittelbuch (Swiss Food Manual) [23] veröffentlicht.

B.1.2.2 Ringversuch

Fünf unbekannte Proben, die zwischen 0,7 % und 3 % (Massenanteil) getrocknetes Sojamehl der Linie GTS 40-3-2 enthielten, wurden von elf Teilnehmern analysiert.

Das 35S-Promotor-spezifische Nachweisverfahren ergab einen prozentualen CV (Variationskoeffizienten, RSD_R) im Bereich von 17 % bis 34 % (siehe Tabelle B.1). Bei den ersten Experimenten des Ringversuches stellte sich heraus, dass das 1%-Soja-ZRM nicht widerspruchsfrei hinsichtlich seines angegebenen Wertes war. Die Untersuchungen ergaben, dass die divergierenden Referenzmaterialien zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Verfahren hergestellt wurden, was zu einem unterschiedlichen Grad des DNA-Abbaus führte. Den Teilnehmern des Ringversuchs wurde geraten, im Verlauf des Ringversuchs das 2%-ZRM zu verwenden und die DNA zu verdünnen, um eine 1 %ige Referenz-DNA-Lösung für die Verwendung bei der quantitativen Bestimmung zu erhalten.

8) Dies ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Zur DNA-Extraktion wurde das in [23] beschriebene Verfahren angewendet. Kurz gesagt wurden 200 ng des Probenmaterials in 1 ml Guanidin-Hydrochlorid/Proteinase K-Pufferlösung (0,5 mol/l bzw. 0,8 mg/ml) für 3 h bei 56 °C lysiert. Nach einem RNase-Verdau wurden 500 µl des gereinigten Extraktes mit 1 ml Wizard®-Siliciumdioxidharz⁹⁾ gemischt und das Harz mit der gebundenen DNA wurde durch Ansaugen durch eine Wizard®-Filtersäule⁹⁾ zurückgewonnen. Nach dem Waschen mit Isopropanol wurde die DNA bei 70 °C in Tris-Pufferlösung mit einer Konzentration von 10 mmol/l und mit einem pH-Wert von 9,0 vom Siliciumdioxidharz eluiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm geschätzt und auf 20 µg/ml eingestellt. Bei der anschließenden PCR-Analyse wurden von jeder Probe 200 ng DNA in zwei unabhängigen Reaktionen analysiert.

Die Proben wurden doppelt analysiert.

Da die mit SA bis SE gekennzeichneten Proben Mischungen dieser divergierende Standards darstellten, konnten die mit diesen Proben erhaltenen Ergebnisse nicht für die Bewertung der Richtigkeit des angewendeten Real-Time PCR-Verfahrens verwendet werden. Die Ergebnisse konnten jedoch für die Einschätzung der Präzision des angewendeten Verfahrens verwendet werden, wobei die beschriebenen Umstände den ungünstigsten Fall widerspiegeln, der zu einer Unterschätzung der Präzision des angewendeten Real-Time PCR-Verfahrens führt [19].

Der Ausschluss von Laboratorien beruht auf den verwendeten Real-Time PCR-Geräten und der statistischen Berechnung der Ausreißer. Das Verfahren wurde für Blockthermocycler entwickelt. Deshalb wurden zwei Laboratorien, die ein LightCycler®-System⁹⁾ verwenden, vor der Berechnung der Ausreißer ausgeschlossen. Der Grund für den Ausschluss einer bestimmten Art von PCR-Geräten war die Beobachtung, dass das angewendete Verfahren einer sorgfältigen Anpassung und Optimierung bedarf, wenn die Durchführung an anderen Real-Time PCR-Geräten erfolgt, als im Verfahren festgelegt. Die verbliebenen Laboratorien wurden zusätzlich nach Grubbs [24] auf Ausreißer untersucht. Es wurden jedoch keine Ausreißer festgestellt. Einzelheiten zum Ringversuch sind in Tabelle B.1 angegeben.

Tabelle B.1 — Angaben zur Validierung für den 35S-Promotor-spezifischen GVO-Nachweis

	Probe				
	SA	SB	SC	SD	SE
Jahr des Ringversuchs	1999	1999	1999	1999	1999
Anzahl der Laboratorien mit vorliegenden Ergebnissen	11	11	11	11	11
Anzahl der Proben je Laboratorium	1	1	1	1	1
Anzahl der ausgeschlossenen Laboratorien	2	2	2	2	2
Anzahl der nach dem Ausschluss verbliebenen Laboratorien	9	9	9	9	9
Anzahl der angenommenen Proben	9	9	9	9	9
Erwarteter Wert (% GVO)	1,4	1,8	3	0,7	1
Mittelwert (% GVO)	1,63	1,76	4,04	0,88	1,73
Medianwert (% GVO)	1,62	1,70	3,46	1,00	1,60
Vergleichstandardabweichung s_R (% GVO)	0,28	0,39	1,36	0,21	0,35
relative Vergleichstandardabweichung RSD_R (in %)	17	22	34	24	20
Vergleichgrenze R ($R = 2,8 \times s_R$)	0,80	1,08	3,82	0,58	0,97

Zusätzlich wurden von vier Teilnehmern vier unbekannte Proben von handelsüblichen Lebensmitteln analysiert, die zwischen 0,3 % und 36 % (Massenanteil), (Mittelwerte) der gentechnisch veränderten Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 enthielten. Das 35S-Promotor-spezifische Nachweisverfahren ergab einen Variationskoeffizienten (RSD_R) in % im Bereich von 17 % bis 28 % [20].

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

B.1.2.3 Molekulare Spezifität

B.1.2.3.1 Allgemeines

Das Verfahren wurde zur Bestimmung einer Zielsequenz entwickelt, die unter der GenBank®¹⁰⁾ Zugangsnummer V00141 beschrieben ist.

Eine Auflistung von gentechnisch veränderten Pflanzen, die den CaMV-35S-Promotor enthalten, ist in [25] 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 gv Pflanze anzeigen, sollten jedoch nicht ohne zusätzliche Bestätigung als Nachweis für das Vorliegen von Produkten, die aus gv Pflanzen stammen, interpretiert werden.

Um zwischen einer Virusinfektion und gv Material zu unterscheiden, können Verfahren zum Nachweis des Blumenkohlmosaik-Virus angewendet werden [28].

B.1.2.3.2 Theoretische Spezifität

Die Spezifität der Primer und Sonden wurde durch eine Recherche der Datenbanken GenBank/EMBL/DBJ¹⁰⁾ theoretisch ermittelt, wobei die Nukleotidsequenzen als zu suchende Sequenzen bei dem BLASTN-Programm 2.2.3¹⁰⁾ [24. April 2002] verwendet wurden. Das Ergebnis der Recherche bestätigte eine vollständige Übereinstimmung ausschließlich mit den erwarteten Zielsequenzen.

B.1.2.3.3 Experimentelle Bestimmung der Spezifität

Die experimentelle Spezifität wurde bestimmt durch Identifizierung von ZRM IRMM-410 aus getrocknetem Sojamehl vom IRMM, das 0 % bis 5 % GTS 40-3-2 Soja enthält, und von Referenzmaterial der Leatherhead Food Research Association International¹⁰⁾ aus Sojamehl mit vollem Fettgehalt (Los-Nr. 2/99-01), das 0 %, 0,3 %, 1,25 % und 2 % GTS 40-3-2 Soja enthält.

Die untersuchten handelsüblichen Lebensmittelmatrices waren Sojamehl, Sojaweißisolat und zusammengesetzte Lebensmittel, die Sojamehl und Sojaweiß enthalten.

B.1.2.4 Optimierung

Die Optimierung erfolgte für das ABI PRISM® 7700 SDS¹⁰⁾ mit der TaqMan®-Chemie¹⁰⁾.

Für das Primer- und Sondendesign wurde die Primer-Express®-Software (Applied Biosystems)¹⁰⁾ angewendet.

B.1.2.5 Nachweisgrenze (LOD)

Da das Verfahren quantitativ ist, wurde die LOD nicht spezifisch bewertet. Es wurde erwartet, dass die Nachweisgrenze besser oder gleich der Bestimmungsgrenze ist, d. h. 50 Genomkopien der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 in 82 000 Genomkopien von konventionellen Sojamehl.

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

B.1.2.6 Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die LOQ wurde durch Messung von Reihenverdünnungen der Ziel-DNA nach [20] bewertet.

Nach Angaben des Verfahrensentwicklers beträgt die LOQ 50 Genomkopien der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 in 82 000 Genomkopien von konventionellen Sojamehl. Hinsichtlich des 1-C-Wertes siehe [20]. Dies ergibt eine geschätzte relative Bestimmungsgrenze von 0,06 (= 50 Kopien/82 000 Kopien × 100 %).

Die im Ringversuch geprüften Konzentrationen sind in Tabelle B.1 aufgeführt.

ANMERKUNG Die Anzahl der Kopien wurde nicht im Ringversuch bestimmt.

B.1.3 Anpassung

Es liegen keine besonderen Angaben vor.

B.1.4 Kurzbeschreibung

Ein 82 bp Fragment der CaMV-35S-Promotorsequenz wird durch PCR mit zwei 35S-Promotor-spezifischen Primern amplifiziert. Die Amplifikate werden während jedes PCR-Zyklus (Echtzeit) mit einer 35S-Promotor-spezifischen Oligonukleotid-Sonde gemessen, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist: FAM als Reporter-Farbstoff und TAMRA als Quencher. Zu diesem Zweck wird TaqMan®-Chemie¹¹⁾ eingesetzt.

Ein 81 bp Fragment der Sojalectin-Gensequenz wird durch PCR bei einer getrennt durchgeführten Real-Time PCR-Reaktion mit zwei Soja-Lectin-Gen-spezifischen Primern amplifiziert und die Amplifikate werden während jedes PCR-Zyklus mit einer Soja-Lectin-Gen-spezifischen TaqMan®-Sonde¹¹⁾ Sonde gemessen.

Die quantitative Bestimmung erfolgt entweder nach dem $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren oder dem Verfahren mit doppelter Kalibrierkurve (siehe B.1.9).

B.1.5 Reagenzien

B.1.5.1 Allgemeines

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 24276:  2006 , 6.6.

B.1.5.2 Wasser

B.1.5.3 PCR-Pufferlösung (ohne MgCl₂), 10fach

B.1.5.4 MgCl₂-Lösung, $c(\text{MgCl}_2) = 25 \text{ mmol/l}$

B.1.5.5 dNTP-Lösung, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ ((jeweils))

B.1.5.6 Oligonukleotide

Einzelheiten zu den Oligonukleotiden sind in Tabelle B.2 aufgeführt.

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

Tabelle B.2 — Oligonukleotide

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in der PCR
Zielsequenz des Referenzgens		
Lectin-F	5'—TCC ACC CCC ATC CAC ATT T—3'	900 nmol/l
Lectin-R	5'—ggC ATA gAA ggT gAA gTT gAA ggA—3'	900 nmol/l
Lectin-TMP	5'—FAM-AAC Cgg TAg CgT TgC CAg CTT Cg-TAMRA—3' ^a	100 nmol/l
GVO-Zielsequenz		
35S-F	5'—gCC TCT gCC gAC AgT ggT—3'	300 nmol/l
35S-R	5'—AAg ACg Tgg TTg gAA CgT CTT C—3'	900 nmol/l
35S-TMP	5'—FAM-CAA AgA Tgg ACC CCC ACC CAC g-TAMRA—3' ^a	100 nmol/l
^a FAM: 6-Carboxyfluorescein, TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin		

Die Länge des Lectin-Amplifikats beträgt 81 bp; die Länge des 35S-Amplifikats ist 82 bp.

B.1.5.7 Thermostabile DNA-Polymerase

AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase¹²⁾

B.1.5.8 Uracil-N-Glykosylase (optional)

B.1.6 Geräte

B.1.6.1 Allgemeines

Soweit nicht anders festgelegt, sollte durchgängig die übliche Laborausüstung angewendet werden.

B.1.6.2 Thermocycler

Das angegebene Temperatur-Zeit-Profil wurde ursprünglich mit dem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System und GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)¹²⁾ geprüft. Nach Anpassung der Reaktionsbedingungen dürfen andere Real-Time PCR-Nachweissysteme verwendet werden.

B.1.6.3 Reaktionsgefäße

Die Reaktionsgefäße müssen für die PCR-Amplifikation in einem Thermocycler geeignet sein, z. B. ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate, MicroAmp® Optical Caps (8 caps/strip, flat) (Applied Biosystems)¹²⁾.

B.1.7 Durchführung: PCR-Ansatz

B.1.7.1 Allgemeines

Die PCR-Ansätze für die Zielsequenz des Referenzgens und die GVO-Zielsequenz sollten in verschiedenen Reaktionsgefäßen angesetzt werden. Multiplex PCR (unter Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker für die Sonden) wurde nicht geprüft oder validiert.

Die Verfahrensbeschreibung gilt für ein Gesamtvolumen je PCR-Ansatz von 50 µl, mit den in Tabelle B.3 angegebenen Reagenzien.

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